

## (12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002年10月3日 (03.10.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/077642 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 33/50,  
33/15, 33/566, A61P 13/12, A61K 45/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/02828
- (22) 国際出願日: 2002年3月25日 (25.03.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2001-88018 2001年3月26日 (26.03.2001) JP  
特願2001-270551 2001年9月6日 (06.09.2001) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 日本新薬株式会社 (NIPPON SHINYAKU CO., LTD.) [JP/JP];  
〒601-8550 京都府 京都市 南区吉祥院西ノ庄門口町  
14番地 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: および  
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 高垣 和史 (TAKAGAKI,Kazuchika) [JP/JP]; 〒305-0051 茨城県 つくば市 二の宮4丁目2番17号 Ibaraki (JP). 勝間 進 (KATSUMA,Susumu) [JP/JP]; 〒305-0051 茨城県 つくば市 二の宮4丁目8番3号二の宮団地7棟403号 Ibaraki (JP). 辻本豪三 (TSUJIMOTO,Gozoh) [JP/JP]; 〒158-0091 東京都 世田谷区 中町1丁目14番18号 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 青山 審, 外 (AOYAMA,Tamotsu et al.); 〒540-0001 大阪府 大阪市 中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka (JP).
- (81) 指定国(国内): JP, US.
- (84) 指定国(広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

添付公開書類:  
— 國際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF SCREENING DRUG FOR PREVENTING/TREATING PROLIFERATIVE GLOMERULAR NEPHRITIS

(54) 発明の名称: 増殖性糸球体腎炎の予防・治療用薬物のスクリーニング方法

(57) Abstract: A method of screening a compound efficacious in preventing/treating proliferative glomerular nephritis, in particular, mesangial proliferative glomerular nephritis characterized by depending on the effect of inhibiting the activation of Edg-5.

(57) 要約:

増殖性糸球体腎炎特にメサンギウム増殖性糸球体腎炎の予防・治療に有効な成 分をスクリーニングする方法であって、Edg-5の活性化を抑制する作用に基 くことを特徴とする方法を提供する。

WO 02/077642 A1

## 明細書

## 増殖性糸球体腎炎の予防・治療用薬物のスクリーニング方法

## 5 技術分野

本発明は、増殖性糸球体腎炎、特にメサンギウム増殖性糸球体腎炎の予防・治療用医薬組成物の有効成分をスクリーニングする方法に関する。

## 背景技術

10 増殖性糸球体腎炎は糸球体内に細胞増殖を伴う糸球体腎炎であって、急性から慢性まで、様々な腎炎が含まれる。慢性腎炎に属するものにメサンギウム増殖性糸球体腎炎と膜性増殖性糸球体腎炎があり、メサンギウム増殖性糸球体腎炎はイムノグロブリンA腎症ともいわれ、世界的に最も一般的な腎疾患の一つである。その病理学的な特徴としては、血尿、循環する Ig A レベルの上昇、Ig A や補15 体 C<sub>3</sub>、フィプロネクチン、コラーゲン等の糸球体への異常な沈着、メサンギウム細胞の増殖等が挙げられる。この疾患の患者のほとんどが透析を必要とする末期の腎不全へと進行することから、早期に適切な治療を施す必要がある。以下、主として本発明をメサンギウム増殖性糸球体腎炎との関係で説明するが、広く増殖性糸球体腎炎に適用されることは明らかである。また、「メサンギウム増殖性糸球体腎炎」を、「イムノグロブリンA腎症（Ig A腎症又は I GAN）」と同意義に用いる。

20 I GANにおけるメサンギウム細胞の増殖反応には、多くの成長因子やサイトカインが関与しているとの報告があり (Floege ら, Kidney Int. 43 : S47-S54, 1993) 、中でもメサンギウム細胞に対し強い増殖作用を示す血小板由来増殖因子 (PDGF : Platelet-Derived Growth Factor) が、重要な役割を担っているとの報告 (Floege ら, Clin. Exp. Immunol. 86 : 334-341, 1991) がある。また、メサンギウム増殖性糸球体腎炎患者において、メサンギウム細胞の増殖に PDGF 受容体が強く関与するとの報告もある (Gesualdo ら, J. Clin. Invest 94 : 50-58, 1994)。このような状況下、PDGF 刺激下でのメサンギウム細胞の増

殖を抑制する物質（P D G F受容体拮抗物質）が、I G A Nの治療又は予防剤として有効と提供された（特開平10-120568号公報）。一方、メサンギウム細胞の増殖とB細胞刺激因子としてクローニングされたインターロイキン6（I L - 6）との関係も知られており、実際、糸球体腎炎ではI L - 6 トランジエニックマウスで高度の蛋白尿を伴うメサンギウム増殖性糸球体腎炎が認められ、抗I L - 6 抗体を投与すると症状の改善が認められたという報告がある（日本臨床、第50巻、2840-2841頁（1992年））。このような観点から、I G A Nの治療、予防剤として、I L - 6 活性阻害物質が提供されている（特開平10-338680、特開平10-338678等）。

しかしながら、I L - 6 活性阻害物質の場合、I L - 6 受容体は多くの細胞（Tリンパ球やBリンパ球、単球、纖維芽細胞、皮膚ケラチノサイト、血管内皮細胞、腎メサンギウム細胞、脳アストロサイト、骨芽細胞）で産生されており、その生理活性は免疫系、造血系、脳神経系、炎症系、内分泌系など多岐にわたることから（ザ・サイトカイン・ハンドブック第2版（The Cytokine Handbook）、アカデミック・プレス社、USA、145-168頁（1994年））、目的とする組織以外の組織に対しても何らかの影響が及ぶ恐れがあり、適用が困難と考えられる。

また、P D G Fアンタゴニストの場合も、それが多くの組織で発現されていることから、I L - 6 受容体と同様に目的以外の作用を及ぼす可能性がある。

従って、増殖性糸球体腎炎、特にメサンギウム細胞の増殖を伴うI G A N等の腎炎に特異的に効果のある医薬の開発が強く求められている。そのためには、多くの化合物（物質）の中から、目的に適う候補化合物を効率よく選択する手段を確立する必要がある。

#### 発明の開示

本発明者らは、増殖性糸球体腎炎、特にメサンギウム細胞の増殖を伴うI G A N等に対して特異的で安全性の高い予防又は治療用医薬の開発を目指して鋭意研究を重ねてきたが、その過程で、E d g (endothelial differentiation gene) ファミリー受容体がメサンギウム細胞の活性化に重要な役割を担っていることを見出した。

E d g ファミリーは、G 蛋白質共役型受容体スーパーファミリーに属する膜結合型受容体蛋白質をコードする遺伝子として既知である。この受容体ファミリーは、7つの膜貫通領域を有しており、薬物のターゲット分子として好適であると考えられる。

5 E d g ファミリーには高い配列ホモロジーを持つ8つのサブタイプ (E d g - 1 ~ E d g - 8) が存在するが、本発明者らは、予想外にも、メサンギウム細胞の増殖が観察されない段階で E d g - 5 が顕著に上方制御されているとの知見を得た。E d g - 5 は細胞増殖や細胞の遊走・アポトーシスに関与すると示唆されている (J Biol Chem 2000 Jan 7;275(1):288-96, Sphingosine 1-phosphate-induced cell proliferation, survival, and related signaling events mediated by G protein-coupled receptors Edg3 and Edg5. An S, Zheng Y, Bleu T) が、E d g - 5 とメサンギウム細胞の増殖との関係は、本発明以前には知られていなかった。

10

ヒト、マウス及びラットの E d g - 5 のアミノ酸配列及びそれをコードするヌクレオチド配列は既知であり、Genbankに登録されている (W099/54351、  
15 W000/60056、Genbankのアクセスション番号 : Human AF034780; mouse AF108020; Rat U10699)。しかし、これらの公報には、E d g - 5 の生体内での機能に関し、上記G-タンパク結合受容体として一般的に知られている活性が列挙されているにすぎない。

20 ヒト、マウス、及びラットの E d g - 5 をコードするヌクレオチド配列をそれぞれ配列番号 1、3 及び 5 に示す。また、これらのヌクレオチド配列のCDS領域によりコードされているアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号 2、4、及び 6 に示す。

本発明者らは、I G A N に関する様々な因子の分子メカニズムを検討するために、c DNAマイクロアレイを用い、I G A N のモデルマウス（以下、「H I GAマウス」と称する）の腎臓における遺伝子発現の変化について解析を行った。該マウスの受精卵は通商産業省生命工学工業技術研究所特許微生物寄託センターに寄託されている (FERM P-18150)。このゲノミックなアプローチによって、一つ一つの遺伝子というよりはむしろ I G A N に関する遺伝子のフ

25

アミリーを同定し、複雑な疾患の進行においてどのような分子レベルの現象が重要であるかを明らかにすることができた。即ち、HIGAマウスの腎臓では、PDGF、PDGF受容体、SPP (sphingosine 1-phosphate) 受容体であるEdg-5 (endothelial differentiation gene-5) など、細胞周期や細胞増殖の制御に関与している幾つかの遺伝子の発現が上昇していた。また、培養ラットメサンギウム細胞を用いる実験で、PDGFはEdg-5のアップレギュレーション（又は上方制御）を伴うメサンギウム細胞の増殖を誘導した。これらの結果は、SPP合成の増加と連結するPDGF-Edg-5シグナルの増強が、IGANにおける腎臓のメサンギウム細胞の増殖において重要な役割を果たしていることを示唆している。しかも、Edg-5の上方制御は、IGANを発症する前、メサンギウム細胞の増殖が顕著でない時点で認められることから、該受容体の上方制御がメサンギウム細胞の増殖、延いてはIGANの発症、進行に重要な役割を担っていることを強く示唆している。

PDGF-刺激によって起るメサンギウム細胞の増殖シグナル伝達機序を模式的に図1に示した。即ち、PDGFで刺激された細胞はPDGFを生産・放出し、オートクライイン及びパラクライインの機構によって細胞表面のPDGF受容体の発現が増加する。PDGFはメサンギウム細胞のスフィンゴミエリナーゼとセラミダーゼを活性化し、SPPの合成が増加し、SPPはまた、活性化した、若しくは凝集性の血小板からも放出される。SPPは、オートクライインでまたは分子内のセカンドメッセンジャーとして働くことにより、メサンギウム細胞の増殖を引き起こすと考えられる。リガンドであるSPPとその受容体Edg-1、Edg-3、Edg-5（特にEdg-5）の合成量の増加は相乗的なものと考えられる。HIGAマウス腎臓でPDGF/PDGFR受容体とEdg-5の発現が増大したという結果は、細胞増殖活性につながる成長因子シグナルとリンクするカスケードの增幅のために、PDGF-SPP-1-Edgパスウェイが正のフィードバックループ中で作用している可能性を示唆している。さらに、メサンギウム細胞からのSPPはEdg-5の発現上昇を通して血小板を活性化し、血小板からのSPPの分泌も促進するというように、IGANの進行中正のフィードバックループ内で次々に作用が起こる。これらの悪循環のすべてがHIGAマウス腎臓において

て作動していると考えられる。HIGAマウスにおける糸球体腎炎の所見は、ヒトの糸球体腎炎に酷似していることから、ヒトの糸球体腎炎においても同様のメカニズムが想定され、こういった観点から、上記の一連のメカニズムとIGANが難治性疾患であることとの関連性が指摘できる。

5 本発明者らは、Edg-5がメサンギウム細胞の増殖を引き起こし、またEdg-5の上方制御がその増殖を増強することから、Edg-5の活性化を抑制する物質が、IGANの特異的な予防・治療薬となりうるとの見解に達した。

即ち、本発明は、

(1) 増殖性糸球体腎炎の予防・治療用薬をスクリーニングする方法であって、  
10 Edg-5の活性化を抑制する作用に基くことを特徴とする方法、  
(2) Edg-5のリガンドと、Edg-5又はそれと同等のポリペプチドとの  
結合を阻害する作用に基くことを特徴とする、上記(1)に記載の方法、  
(3) Edg-5又はそれと同等のポリペプチドが以下の群から選択される上  
記(2)に記載の方法：

15 ① 配列表の配列番号2、4若しくは6に記載のアミノ酸配列で示されるポリ  
ペプチド又はその断片であって、Edg-5のリガンドとの結合活性を有するポ  
リペプチド、

② 配列表の配列番号2、4若しくは6に記載のアミノ酸配列と80%以上の  
相同性を有するアミノ酸配列で示されるポリペプチド又はその断片であって、E  
d g - 5のリガンドとの結合活性を有するポリペプチド、

20 ③ 配列表の配列番号2、4若しくは6に記載のアミノ酸配列において、1個  
以上のアミノ酸の欠失、置換、付加若しくは挿入を有するアミノ酸で示されるポ  
リペプチド又はその断片であって、Edg-5のリガンドとの結合活性を有する  
ポリペプチド、及び

25 ④ 前記①～③のいずれかに記載のポリペプチドを含有するポリペプチド、

(4) 上記(2)又は(3)に記載のポリペプチドを含有する細胞、該細胞由  
來の細胞膜画分若しくは単離された蛋白質を用いる、上記(2)又は(3)に記  
載の方法、

(5) 前記細胞が、上記(2)又は(3)に記載のポリペプチドをコードする

ポリヌクレオチドを導入され、該ポリヌクレオチドを発現している細胞である、

上記（4）に記載の方法、

（6）前記ポリヌクレオチドが以下の群から選択される、上記（5）に記載の方法：

5 ① 配列表の配列番号1、3若しくは5に記載の塩基配列で示されるポリヌクレオチド；

② 配列表の配列番号1、3若しくは5に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチドに対してその全長にわたり少なくとも80%の同一性を有するポリヌクレオチド；

10 ③配列表の配列番号1、3若しくは5に記載の塩基配列と縮重を介して異なる塩基配列で示されるポリヌクレオチド；及び

④ 上記①～③に記載のポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズしうるポリヌクレオチド、

15 （7）E dg-5又はそれと同等のポリペプチドとリガンドとを接触させた場合と、E dg-5又はそれと同等のポリペプチド、リガンドおよび試験物質とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする、上記（2）～（6）のいずれかに記載の方法、

20 （8）比較を、E dg-5又はそれと同等のポリペプチドを含有する細胞に対するリガンドの刺激活性（シグナル伝達作用）の変化、E dg-5又はそれと同等のポリペプチドに対するリガンドの結合量の変化、または細胞内でのE dg-5の発現・産生量の変化に基づいて行なうことを特徴とする、上記（2）～（7）のいずれかに記載の方法、

（9）E dg-5を発現しうる細胞におけるE dg-5の産生量又はmRNAの量を定量することを特徴とする、上記（1）に記載の方法、

25 （10）配列番号2、4若しくは6に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又はその一部を用いてE dg-5のmRNAを定量することを特徴とする、上記（9）に記載の方法、

（11）上記（1）～（10）のいずれかに記載の方法を実施するためのキット、

(12) 上記(1)～(10)のいずれかに記載の方法又は上記(11)に記載のキットを用いて得られる増殖性糸球体腎炎の予防・治療薬、

(13) 上記(1)～(10)のいずれかに記載の方法又は上記(11)に記載のキットを用いて、E<sub>d</sub>g-5のリガンドと、E<sub>d</sub>g-5又はそれと同等のポリペプチドとの結合を阻害するか、E<sub>d</sub>g-5の発現・産生を阻害する作用を有する物質をスクリーニングする工程、前記物質の増殖性糸球体腎炎に対する予防又は治療効果を確認する工程、及び前記工程で増殖性糸球体腎炎に対する予防又は治療効果が確認された物質を有効成分として含有する増殖性糸球体腎炎の予防・治療薬の製造方法、

10 などに関する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、PDGF一刺激によって起るメサンギウム細胞の増殖シグナル伝達機序を示す模式図である。

15 図2は、それぞれ、(A) 6週齢及び(B) 25週齢の、雌のHIGAマウスより腎臓を摘出し、パラフィンで包埋を行い、パラフィン切片を PAS染色したものを光学顕微鏡で観察した結果を示す写真の模写図である。

20 図3は、標準化腎臓cDNAライブラリーを用いて調製したcDNAマイクロアレイを用い、HIGAマウス(縦軸)と、該HIGAマウスと年齢及び性別が等しいddYマウス(横軸)の腎臓から調製したmRNAを用いて遺伝子発現を解析した結果を示す図であり、上は6週齢、下は25週齢の動物における解析結果である。

25 図4は、それぞれ、6週齢(6W)及び25週齢(25W)のHIGAマウスと、該HIGAマウスと年齢及び性別が等しいddYマウスの腎臓から調製したmRNAを用いてE<sub>d</sub>gファミリーの8つのサブタイプの発現レベルについて解析した結果を示す写真の模写図(A)、及び結果をHIGA/ddYの比で表したグラフ(B)である。

図5は、PDGF-BB、bFGF又はEGFによってラットメサンギウム培養細胞に増殖刺激を与え、各処理の2、4、8、26時間後にXTT assay kit(ロッシ

エ・ダイアグノティクス社)を用いてメサンギウム細胞の増殖を測定した結果を示す図である。図中、四角はbFGF、三角はPDGF-BB、丸はEGFを培地に添加したときの結果を示す。

## 5 発明を実施するための最良の形態

本発明のスクリーニング方法は、Edg-5の活性化がメサンギウム細胞増殖を刺激し、もってIGANの発症、進行をもたらすとの知見に基いており、生体内でのEdg-5の活性化を抑制する物質、とりわけEdg-5-リガンド結合を阻害する任意の物質を標的としている。

10 本明細書中、「Edg-5の活性化」とは、Edg-5にリガンドが結合することによりその生理活性(生物活性)が発揮されること、又は、Edg-5の上方制御によりその生理活性が増強されること、その他Edg-5の生理活性が発揮されることをいう。なお、Edg-5の生理活性としては、メサンギウム細胞表面に発現しているEdg-5がリガンドと結合することにより、細胞内にシグナルを伝達し、図1に記載の一連の増殖シグナルの伝達を刺激し、メサンギウム細胞を増殖させるという活性が例示される。

15 また、本明細書中、Edg-5の「上方制御(アップレギュレーション)」とは、当該技術分野で用いられる通常の意味を有し、Edg-5遺伝子の発現が増加することを意味する。Edg-5遺伝子の上方制御は、例えば、図1に模式的に示した一連のメサンギウム細胞の増殖シグナル伝達機序のいずれかの段階で作用し、正のフィードバック機構を介するEdg-5遺伝子の発現増大などの形で起ると考えられる。

20 従って、Edg-5の活性化を抑制する物質は、Edg-5の上方制御を抑制する物質を包含し、そのような物質としては、リガンド-Edg-5結合反応の阻害物質のみならず、図1のシグナル伝達機構の任意の部位をブロックする物質が例示されるが、それらに限定されない。

25 「Edg-5又はそれと同等のポリペプチド」とは、リガンドと結合して、図1に記載の細胞活性化シグナルを伝達し得るEdg-5蛋白質、Edg-5蛋白質と同質の活性を有するポリペプチド、リガンドとの結合に必須の部分を有するそ

これらの断片、であり、以下のポリペプチド類が例示される。

「実質的に同質の活性」とは、E d g - 5に特徴的なリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用と、同質の活性を指す。従って、実質的に同質の活性を有するポリペプチドは、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性においてE d g - 5と同等（例、約0.01～100倍、好ましくは0.03～30倍、より好ましくは0.1～10倍）の活性を有する。リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができる。

E d g - 5又はそれと同等のポリペプチドの例として、配列番号2、4若しくは6に記載のアミノ酸配列を含有する蛋白質及び、これら配列番号2、4若しくは6のいずれかと約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する配列を含有し、かつ、配列番号2、4若しくは6に記載のアミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有するポリペプチド；配列番号2、4若しくは6に記載のアミノ酸配列に対して、1個以上（好ましくは、1～30個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～数個のアミノ酸の欠失、置換又は挿入がなされたアミノ酸配列を含有し、かつ、配列番号2、4若しくは6に記載のアミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有するポリペプチドが挙げられる。

本発明の好ましい実施態様では、E d g - 5又はそれと同等のポリペプチドとして、

① 配列表の配列番号2、4若しくは6に記載のアミノ酸配列で示されるポリペプチド又はその断片であって、E d g - 5のリガンドとの結合活性を有するポリペプチド、

② 配列表の配列番号2、4若しくは6に記載のアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列で示されるポリペプチド又はその断片であって、E d g - 5のリガンドとの結合活性を有するポリペプチド、

③ 配列表の配列番号2、4若しくは6に記載のアミノ酸配列において、1個以上のアミノ酸の欠失、置換、付加若しくは挿入を有するアミノ酸で示されるポリペプチド又はその断片であって、E d g - 5のリガンドとの結合活性を有するポ

リペプチド、及び

- ④ 前記①～③のいずれかに記載のポリペプチドを含有するポリペプチド。  
が挙げられる。

本明細書中、上記の「E d g - 5 又はそれと同等の活性を有するポリペプチ  
5 ド」を、総称して E d g - 5 蛋白質等という。

「E d g - 5 のリガンド」とは、天然に存在する E d g - 5 のリガンドである S  
PP、SPP と同様に E d g - 5 に結合して図 1 に記載の細胞増殖シグナルを伝  
達させる活性を有する SPP 類似化合物を指す。そのようなリガンドは、E d g  
- 5 溶液を用いた結合実験によって得ることができる。SPP は E d g - 5 の天  
10 然のリガンドであり、E d g - 5 を発現する細胞の増殖を刺激することが明らか  
であることから本発明方法にとって好ましいリガンドである。

本発明のスクリーニング方法で得られる物質は増殖性糸球体腎炎の予防・治療  
薬として有用でありうることから、本明細書中では抗 I GAN 薬 (anti-IGAN  
drug) と称する。なお、本発明の抗 I GAN 薬の内、リガンドと E d g - 5 との  
15 結合を阻害する物質を「E d g - 5 アンタゴニスト」と呼称することもある。本  
発明の抗 I GAN 薬は E d g - 5 とリガンドとの結合反応を阻害し、又は、一連  
のシグナル伝達機構の抑制を介して E d g - 5 遺伝子の上方制御を抑制すること  
により、メサンギウム細胞の増殖を阻止し I GAN の治療・予防効果を發揮する。

本発明方法の対象である抗 I GAN 薬、E d g - 5 とリガンドとの結合を阻害  
20 する E d g - 5 アンタゴニスト、アンタゴニストの候補となる物質には特に限定  
がなく、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵  
生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが含まれる。これらの物  
質は新規物質であってもよいし、公知物質であってもよい。一例として、WO 9  
9 / 54351、WO 00 / 60056 に記載の E d g - 5 に対するモノクロー<sup>25</sup>  
ナル抗体が挙げられる。

本発明のスクリーニング方法で得られる E d g - 5 の活性化の抑制作用を有す  
る化合物は増殖性糸球体腎炎以外の E d g - 5 による他の細胞シグナル伝達機構  
にも有効である。

本発明のスクリーニング方法で得られた抗 I GAN 薬は、次いで、医薬として

の有用性（バイオアベイラビリティー、製剤設計上の条件など）に関して必要とされる種々の試験に供し、最終的に増殖性糸球体腎炎の予防又は治療のための医薬として用いることができる。そのような試験の種類及び方法は、使用目的に応じて、当該技術分野で既知のものから、適宜選択することができる。例えば、急性毒性、投与形態に応じた特性（溶解性）等が含まれる。

5

10

本発明のスクリーニング方法には、E d g-5蛋白質等を含有する細胞、該細胞由来の細胞膜画分若しくは単離された蛋白質を用いることができる。E d g-5蛋白質等を含有する細胞は、上記の定義に従い、E d g-5蛋白質等を産生している細胞であり、天然のE d g-5産生細胞及びDNA組換え技術で得られた組換え体を含む。前者の例として、メサンギウム細胞、例えば、H I G Aマウスの腎臓由来のメサンギウム細胞を挙げることができる。後者は、E d g-5蛋白質等をコードするポリヌクレオチド（RNA及びDNAを包含する）が導入され、それを発現して活性なE d g-5蛋白質等を産生している形質転換体を指す。

15

20

本明細書中、「ポリヌクレオチド」とは、修飾された、または修飾されていないRNAもしくはDNAを含む任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドを意味する。「ポリヌクレオチド」は、一本鎖および二本鎖DNA、一本鎖および二本鎖領域の混合物または一本鎖、二本鎖および三本鎖領域の混合物であるDNA、一本鎖および二本鎖RNA、ならびに一本鎖および二本鎖領域の混合物であるRNA、一本鎖もしくはより通常的には二本鎖もしくは三本鎖、または一本鎖および二本鎖領域の混合物等の、DNAおよびRNAを含むハイブリッド分子を含む。

25

形質転換細胞は、後述の実施例にも記載したように、E d g-5蛋白質等をコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを適當な発現ベクターに挿入し、該ベクターで宿主細胞を形質転換することにより得られる。そのような方法は当該技術分野で既知であり、例えば、Davisら、*Basic Methods in Molecular Biology* (1986) ; Sambrookら、*Molecular Cloning; A Laboratory Manual*、第2版；コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ・プレス、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク (1989) などに記載の方法を参照して行うことができる。

ポリヌクレオチドは、E d g - 5 蛋白質等をコードする限り、任意のヌクレオチド配列を有するものであって良いが、好ましくは配列表の配列番号2、4又は6に記載のヌクレオチド配列を有するDNA又はこれらとストリンジェントな条件下でハイブリダイズしうるDNAである。ここに、ストリンジェントな条件とは上記のモレキュラークローニング：ア ラボラトリー・マニュアル第2版などに記載の条件が挙げられる。例えば、ハイブリダイズの条件は、50%ホルムアミドを含む6XSSC中で42°C、24時間等であり、洗浄の条件は、0.1XSSC、68°C、30分等である。

宿主細胞も任意であり、大腸菌等の細菌細胞、酵母細胞等の真菌細胞、ショウジョウバエS2 (*Drosophila S2*) 等の昆虫細胞、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞 (CHO) 、ヒト胎児性腎臓由来細胞 (HEK293) 、COS、HeLa 等の動物細胞が挙げられ、中でもCHOおよびHEK293が好ましい。

それぞれの宿主に適したベクターも上記の教科書に記載されており、また当業者にとって既知であるが、大腸菌由来のプラスミド (例、pBR322) 、枯草菌由来のプラスミド (例、pUB110) 、酵母由来のプラスミド (例、pSH19) 、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pCI-NEO (Gene Bank Accession No. U47120) 、pCDNA3.1 (Invitrogen) などが用いられる。

宿主が哺乳動物細胞の場合、ベクターはpCI-NEOまたはpCDNA3.1が好ましい。

プロモーターは、E d g - 5 遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SRαプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。これらのうち、CMVプロモーター、SRαプロモーターなどを用いるのが好ましい。

形質転換の方法も当該技術分野で既知であり、例えば動物細胞を形質転換するには、細胞工学別冊8新細胞工学実験プロトコール、263-267 (1995) (秀潤社発行) 、ヴィロロジー (Virology) , 52巻, 456 (1973) に記載の方法に従って行なうことができる。このようにして、E d g - 5 蛋白をコ

ードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体が得られる。該形質転換体はそれを適當な培地で培養すると E d g - 5 を細胞表面に発現する。

形質転換体の培地、培養条件は当該技術分野で既知であり、当業者が適宜選択することができる。例えば、宿主が動物細胞である形質転換体の場合、MEMダルベッコ培地、RPMI1640培地、ハムF-12培地を用いることができ、MEMダルベッコ培地が好ましい。また pHは、約 7.4 付近が好ましい。培養は通常、約 20°C～42°Cで約 2 時間から 2 日間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。以上のようにして、形質転換体の細胞膜に E d g - 5 受容体蛋白を生成させることができる。

本発明のスクリーニング方法には、上記の E d g - 5 蛋白質等を含有する細胞そのものを用いるのみならず、該蛋白質等を含有する細胞膜画分、及び組換え E d g - 5 蛋白質等を用いることができる。

また、E d g - 5 蛋白質等を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

本発明の E d g - 5 蛋白質等を含有する細胞としては、該蛋白質等を発現している宿主細胞を指し、上記のメサンギウム細胞や形質転換体が挙げられる。

本発明方法に用いる細胞は、細胞表面に E d g - 5 又は E d g - 5 と同等の活性（例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有する蛋白質を発現しており、該リガンド結合領域にリガンドが結合することによって増殖を刺激される細胞であり、細胞膜画分はそのような細胞から常法に従って得ることができる。

細胞膜画分は、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン（Kinematica社製）による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画

法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500 rpm～3000 rpm）で短時間（通常、約1分～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000 rpm～30000 rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈殿を膜画分とする。該膜画分中には、発現したE dg-5蛋白質等と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

組換えE dg-5蛋白質等は、大腸菌等で発現させたE dg-5 DNAの発現産物を常法通り単離精製することにより得ることができる。

一つの態様では、本発明のスクリーニング方法は、E dg-5蛋白質等とリガンドとを接触させた場合と、E dg-5蛋白質等、リガンドおよび試験物質とを接触させた場合との比較を行なうことによって実施することができる。

試験物質の存在下で、リガンドのE dg-5活性化作用が阻害されていれば、その物質は抗IGAN薬の候補である。

試験物質の存在下又は非存在下で、リガンドとE dg-5蛋白質等を接触させる方法は、E dg-5蛋白質等を含有する細胞、又は該細胞から調製されるE dg-5蛋白質等を含有する細胞膜画分又はE dg-5蛋白質等を用いて行うことができる。

比較は、①E dg-5又はそれと同等のポリペプチドを含有する細胞に対するリガンドの刺激活性（シグナル伝達作用）の変化、②E dg-5又はそれと同等のポリペプチドに対するリガンドの結合量の変化、さらには、③細胞内でのE dg-5の発現・產生量の変化等に基づいて行うことができる。

①E dg-5又はそれと同等のポリペプチドを含有する細胞に対するリガンドの刺激活性（シグナル伝達作用）の変化に基く方法

より具体的には、本発明は、E dg-5のリガンド（例えばSPP）をE dg-5蛋白質等を含有する細胞に接触させた場合と、E dg-5のリガンドと試験化合物をE dg-5蛋白質等を含有する細胞に接触させた場合におけるE dg-5を介する細胞へのシグナル伝達阻害作用を測定して比較することを含むE dg-5アンタゴニストをスクリーニングする方法を提供する。

シグナル伝達は、例えば、細胞の増殖（細胞数の変化）や、E d g-5を介する細胞刺激活性（例えば、細胞内C a遊離、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内c AMP生成、細胞内c GMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-f o sの活性化、p H低下をもたらす物質の産生を抑制する活性などを公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することにより実施できる。E d g-5蛋白質等を含有する細胞は、メサンギウム細胞等のそれ自身がE d g-5を産生する細胞、上記の形質転換体等を含む。

上記の方法を実施するには、まず、本発明のE d g-5蛋白質等を細胞膜表面に発現する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーアーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、培養後の細胞数を計数するか、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、カルシウムイオン、p H低下物質）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってよい。また、c AMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

細胞数の測定には、市販のXTT細胞増殖アッセイキット（ロシュ ダイアグノスティクス社）を用いて行う。このキットを用いて得られる結果は、増殖細胞数と強く相関している。

酸性化物質の酸性に対する阻害活性は、市販のマイクロフィジオメーターを用いて行なうことができる。これは、酸性化物質は、シグナル応答に対応して細胞内シグナリングプロセスを活性化するために必要な代謝活性が増大し、微少の酸性物質が排出されることによる。よって、細胞のシグナル応答（代謝の活性化、増殖）を細胞外液の酸性化率（p H変化）に基いて検出することができる。そのようなp H変化は市販の装置、例えば、シリコンセンサーチップを用いるサイトセンサー（モレキュラー デバイス社）で検出することができる。

また、細胞外刺激を受けると細胞内カルシウム濃度が一時的に上昇するので、 $\text{Ca}^{2+}$ イオンも、細胞刺激伝達の指標となる。 $\text{Ca}^{2+}$ イオンも市販の装置で測定することができ、たとえばFLIPRシステム(Fluorometric Imaging Plate Reader、モレキュラー・デバイス社)が使用可能である。

5 ②E d g-5又はそれと同等のポリペプチドに対するリガンドの結合量の変化に基づく方法

より具体的には、本発明は、標識したリガンドを、E d g-5蛋白質等に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物をE d g-5蛋白質等に接触させた場合における、標識したリガンドの該E d g-5蛋白質等に対する結合量を測定し、比較すること；標識したリガンドを、E d g-5蛋白質等を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物をE d g-5蛋白質等を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較すること；標識したリガンドを、E d g-5をコードするポリヌクレオチドを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したE d g-5蛋白質等に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本E d g-5をコードするポリヌクレオチドを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したE d g-5蛋白質等に接触させた場合における、標識したリガンドの該E d g-5蛋白質等に対する結合量を測定し、比較すること、を含むスクリーニング方法を提供する。

上記方法には既述の動物由来の細胞、形質転換体、細胞膜画分、組換えE d g-5蛋白質等を用いることができる。細胞は固定化されていても良い。

標識したリガンドとしては、当該技術分野で既知の方法で標識されたリガンドを用いることができ、例えば、 $^3\text{H}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$ などで標識されたリガンドが挙げられる。具体的には、E d g-5蛋白質等を含有する細胞または細胞膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりE d g-5標品を調製する。バッファーには、pH 4~10(望ましくはpH 6~8)のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとE d g-5との結合を阻害しないバッファーを用いる。非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、

Tween-80™ (花王アトラス社)、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMS F、ロイペプチソ、E-64 (ペプチド研究所製)、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01mI～2mIのEdg-5溶液に、一定量の標識したリガンドを添加し、同時に10nMの試験化合物を共存させる。非特異的結合量 (NSB) を知るために大過剰の未標識のリガンドを加えて同様に反応させる。反応は約0℃から37℃で、約10分から4時間、好ましくは約30分から2時間行う。反応後、ガラス纖維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス纖維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはγ-カウンターで計測する。試験物質がない場合のカウント ( $B_0$ ) から非特異的結合量 (NSB) を引いたカウント ( $B_0 - NSB$ ) を100%とした時、特異的結合量 ( $B - NSB$ ) が、例えば、50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択する。

③細胞内でのEdg-5の発現・産生量の変化に基づく方法

③-1 mRNA量の変化

より具体的には、本発明は、例えば、ヒト以外の哺乳動物の血液、特定の臓器、該臓器から単離した組織若しくは細胞、または(ii) 形質転換体等に含まれるEdg-5蛋白質等のmRNA量を測定することを含むEdg-5アンタゴニストのスクリーニング方法を提供する。

Edg-5蛋白質等のmRNA量の測定は具体的には以下のようにして行なうことができる。正常あるいは疾患モデル動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より好ましくはIGANのモデルマウスであるHIGAマウス）に対して、試験物質を投与し、一定時間（例えば、数時間～数週間、好ましくは4時間）経過した後に、血液、あるいは特定の臓器（腎臓）、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた細胞に含まれるEdg-5蛋白質等のmRNAを、TaqMan PCRなどの手法を用いることにより、あるいは自体既知のノザンプロットを行って解析する。

あるいは、Edg-5蛋白質等を発現する形質転換体を前述の方法に従い作製

し、培養する際に試験物質を培地中に混合させ、一定時間培養後（数時間～数日、好ましくは4時間）、該形質転換体に含まれるE d g-5蛋白質等のmRNA量を定量、解析することにより行なうことができる。

### ③-2 E d g-5蛋白質等の量の変化

より具体的には、本発明は、例えば、(i) ヒト以外の哺乳動物の臓器、該臓器から単離した組織若しくは細胞等を破壊した後、細胞膜画分を単離し、細胞膜画分に含まれるE d g-5蛋白質等を定量することを含む、E d g-5アンタゴニストのスクリーニング方法、(ii) E d g-5蛋白質等を発現する形質転換体等を破壊した後、細胞膜画分を単離し、細胞膜画分に含まれるE d g-5蛋白質等を定量することを含む、E d g-5アンタゴニストのスクリーニング方法、

(iii) ヒト以外の哺乳動物の臓器、該臓器から単離した組織若しくは細胞等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表層でのE d g-5蛋白質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該蛋白質を確認することを含む、E d g-5アンタゴニストのスクリーニング方法、(iv) E d g-5蛋白質等を発現する形質転換体等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表層での該受容体蛋白質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該蛋白質を確認することを含むE d g-5アンタゴニストのスクリーニング方法を提供する。

細胞膜画分に含まれるE d g-5蛋白質等の定量は具体的には以下のようにして行なう。

(i) 正常あるいは疾患モデル動物（正常あるいは疾患モデル動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より好ましくはIGANのモデルマウスであるH I G Aマウス）に対して、試験物質を投与し、一定時間（例えば、数時間～数週間、好ましくは4時間）経過した後に、血液、あるいは特定の臓器（例えば腎臓）、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた臓器、組織または細胞等を、例えば、適当な緩衝液（例えば、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、ヘペス緩衝液など）等に懸濁し、臓器、組織あるいは細胞を破壊し、界面活性剤（例えば、トリトンX 100<sup>TM</sup>、ツイーン20<sup>TM</sup>など）などを用い、さらに遠心分離や濾過、カラム分画などの手

法を用いて細胞膜画分を得る。

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎は上記した方法と同様にして行う。最終的に得られた該膜画分中には、発現した E d g - 5 蛋白質等と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。細胞膜画分に含まれる E d g - 5 蛋白質は、例えば、E d g - 5 に対する抗体を用いたサンドイッチ免疫測定法、ウエスタンプロット解析などにより定量することができる。かかるサンドイッチ免疫測定法は自体既知の方法で行うことができ、ウエスタンプロットは自体公知の手段により行なうことができる。抗体の取得及び該抗体の使用方法は既知である（例えば、W099/54351、W000/60056参照）。

(ii) E d g - 5 蛋白質等を発現する形質転換体を前述の方法に従い作製し、細胞膜画分に含まれる E d g - 5 蛋白質等を定量することができる。即ち、E d g - 5 蛋白質等を発現する形質転換体を前述の方法に従い作製し、培養する際に試験物質を培地中に混合させ、一定時間培養後（数時間～数日、好ましくは4時間）、細胞膜における E d g - 5 蛋白質等を上記と同様に定量することにより行なうことができる。

また、別の態様として、本発明のスクリーニング方法は、E d g - 5 を発現する細胞における E d g - 5 の産生量又はmRNA量を定量することによって実施することができる。この方法は、上記「③細胞内での E d g - 5 の発現・産生量の変化に基づく方法」の欄に記載の方法に順じて行うことができる。

本発明はまた、上記スクリーニング方法を実施するためのキットを提供する。そのようなキットは、スクリーニング方法により異なるが、例えば以下のものからなる。

本発明の抗 I G AN薬が E d g - 5 アンタゴニストである場合、スクリーニング用キットには、E d g - 5 のリガンドと、E d g - 5 蛋白質等、E d g - 5 蛋白質等を含有する細胞、またはE d g - 5 蛋白質等を含有する細胞の膜画分を含有するものが含まれる。さらに、使用するスクリーニング方法に応じて、阻害作用の効果を測定するための適当な試薬、装置、キットなども含まれる。

本発明の E d g - 5 アンタゴニストのスクリーニング用キットの例として、以

下のものが挙げられる。

1. E d g - 5 蛋白質等を発現させた細胞を 96 穴プレートに  $5 \times 10^4$  個／穴で継代し、37°C、5%CO<sub>2</sub>、95%airで1日間培養したもの。

2. 標識リガンド：市販の<sup>3</sup>H、<sup>125</sup>I、<sup>14</sup>C、<sup>35</sup>Sなどで標識した S P P。水溶液の状態のものを 4°C あるいは -20°C にて保存し、用時に測定用緩衝液にて 10 nM に希釈する。

3. リガンド標準液：S P P を 0.1% F A F ウシ血清アルブミン（シグマ社製）を含む P B S で 1 mM となるように溶解し、-20°C で保存する。

4. リガンドの E d g - 5 蛋白質等に対する活性化作用又は結合を測定するためのキット又は試薬

本発明のキットには、具体的なスクリーニングの方法に応じて、上記の、または上記以外の既知の構成であってよい。後述の実施例では、被検物質存在下での実験と、被検化合物の非存在下での実験を行っているが、予め決定した条件下で、リガンド及び E d g - 5 発現細胞を用いて測定した E d g - 5 発現量の変化に基く標準曲線を作成しておき、被検物質の存在下での測定量を該標準曲線と比較することで、阻害作用を判定するのが好都合である。

E d g - 5 アンタゴニスト以外の抗 I G A N 薬である場合、キットには適当な標準物質と被検物質とを用いて E d g - 5 mRNA 又は E d g - 5 の量を測定するための装置が含まれる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物（E d g - 5 アンタゴニスト等の抗 I G A N 薬）は例えばリガンドと E d g - 5 との結合を阻害することにより、図 1 で模式的に示したメサンギウム細胞の増殖にいたる一連のシグナル伝達機構の活性化を抑制するので、I G A N の予防及び治療に有用である。得られた物質は、通常の薬理試験に供され、適当な剤形、例えば、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などに、製剤の分野で既知の固体又は液状担体を用い、所望により、結合剤、賦形剤、潤滑剤、甘味剤、香味剤などと共に製剤化される。

以下に実施例を示して、本発明を詳しく説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

### 実施例1 cDNAマイクロアレイ及びRT-PCRによるIGANの解析

#### (1) IGANのモデルマウスの作成

IGANモデルマウス（以下、HIGAマウスという）はクローズドコロニーとして市販のddYマウスを用い、選択育種により選抜して得ることができる。,

5

#### 方法：

1) クローズド・コロニーであるddY系マウス（日本エス・エル・シー株式会社）の雌52匹と雄52匹（G<sub>0</sub>世代）を使用する。これらマウスの4ヶ月齢における血清IgA値の平均（mg/dl）は、雌が27.1±2.2、雄が43.3±3.3であった。

10

2) 雌雄それぞれから高値を示す5匹を選抜し（G<sub>0</sub>選抜個体）、これらを交配することによって次世代（選抜第1代；G<sub>1</sub>世代）を得た。G<sub>0</sub>選抜個体の平均血清IgA値は、雌が65.0±7.9、雄が90.5±2.3であった。G<sub>1</sub>世代における平均血清IgA値（4ヶ月齢）は、雌が44.2±4.0（n=52）、雄が58.4±6.0（n=55）であった。

15

3) 次にG<sub>1</sub>世代より、4ヶ月齢の血清IgA値を指標として6ペアの雌雄を選抜し、これらを交配することによってG<sub>2</sub>世代を得た。G<sub>1</sub>選抜個体の平均血清IgA値は、雌が109.6±12.6、雄が147.8±15.6であり、G<sub>2</sub>世代の平均値（4ヶ月齢）は、雌が161.0±12.0（n=54）、雄が180.4±18.1（n=42）であった。

20

4) 同様に、毎世代4ヶ月齢における血清IgA値を指標とする選抜交配を繰り返した。その結果、第4代で選抜交配による効果は頭打ちになった。なお、G<sub>2</sub>選抜個体の平均血清IgA値は、雌が293.5±28.2、雄が358.9±50.6であり、G<sub>3</sub>世代の平均値（4ヶ月齢）は、雌が159.4±11.9(46)、雄が222.6±27.2(42)であった。さらに、G<sub>3</sub>選抜個体の平均血清IgA値は、雌が235.8±25.3、雄が548.7±130.3であり、G<sub>4</sub>世代の平均値（4ヶ月齢）は、雌が238.5±21.0(50)、雄が214.8±20.3(39)であった。

25

40世代に渡る兄妹交配を経て近交系として育成されたマウス受精卵は、受託番号FERM P-18150の下で、通商産業省生命工学工業技術研究所特許微生物寄託センター寄託されている（受託日：平成12年12月25日）。

このHIGAマウスは、①血中のIgA濃度が高いこと、②腎臓の糸球体にIgAが高濃度に沈着すること、③前記②が引き金となって、メサンギウム細胞の増殖お

およびメサンギウム基質の造成が起こり、糸球体硬化症を発症することを特徴とする。このHIGAマウスの発症する糸球体腎炎は、ヒトIgA腎症に酷似している。

HIGAマウスは一貫して高い血清IgAレベルを示し、該動物の腎組織には緩やかなメサンギウム細胞の増殖から、細胞外基質の蓄積を伴うメサンギウムの顕著な増大まで各種のメサンギウムの傷害が顕微鏡下で観察される。HIGAマウスはヒトIGANのほぼ全ての臨床的・病理的特徴を示すことから、ヒトIGANの適当な動物モデルであると考えられる。

#### (2) HIGAマウス腎臓の組織学的な解析

HIGAマウスの腎臓の重量は6週齢においてはddYマウスとほぼ等しい(292 ± 6.1 vs. 278 ± 7.5 mg, n = 4)が、25週齢ではHIGAマウスのほうが明らかに大きくなる(465 ± 15.2 vs. 395 ± 9.5 mg, n = 4, P < 0.01)。

HIGAマウスでは約10-25週齢の間にメサンギウム細胞の増殖が観察され、40週齢を過ぎるとメサンギウムの基質の顕著な増大が見られる。この顕微鏡的に病理的な変化を観察できる時期の前後、すなわち6週、25週齢においてHIGAとコントロールとしてのddYについて、組織学的な解析を行った。

6週齢及び25週齢それぞれの雌のHIGAマウスより腎臓を摘出し、パラフィンで包埋を行った。パラフィン切片につき PAS染色を行い、光学顕微鏡を用いて観察を行った。この組織学的研究において、6週齢では病理的特徴は検出されなかった(図2(A))。一方、25週齢においてはメサンギウム細胞が顕著に増殖し、メサンギウム基質の増大によりボウマン嚢や糸球体の毛細血管が圧迫されていた(図2(B))。

#### (3) cDNAマイクロアレイを用いるHIGAマウスの腎臓における遺伝子発現変化の解析

DNAマイクロアレイによる解析は、それぞれ6週齢と25週齢のHIGAマウス及びddYマウスの腎臓より調製したmRNAを錠型として用いて行った。

実施例に記載のラット腎糸球体のメサンギウム細胞の培養及び各処理、それを用いる標準化腎臓cDNAマイクロアレイの作製、cDNAプローブの調製、ハイブリダイゼーションとマイクロアレイの蛍光強度の測定、及び半定量的RT-PCRは以下の方法で行った。

### 1) メサンギウム細胞の培養及び各処理

常法に従いラット腎糸球体のメサンギウム細胞の培養を行った。細胞の培養には10% (v/v) ウシ胎児血清 (FCS) を添加したRPMI1640を用いた。6穴プレートで培養したメサンギウム細胞に16-24時間スタベーションをかけ、成長因子若しくはSPPを添加した、0.4% FAF(Fatty Acid Free)-BSAを含む無血清のRPMI1640でインキュベーションすることにより、このSPP処理を行った。各処理の2、4、8、26時間後にXTT assay kit (ロッシェ・ダイアグノティクス社)を用いてメサンギウム細胞の増殖を測定した。また、各処理の0.5、2、4、8、26時間後にIsogen (ニッポンジーン) を用い、添付の指示に従い、total RNAの単離を行つた。

### 2) 標準化腎臓cDNAマイクロアレイの作製

Bonaldo et alの方法 (U.S.P. 5702898) に一部改良を施して標準化cDNAマイクロアレイを作成した。詳細は、本出願人による特願2000-329998に記載されている。即ち、cDNAライブラリーより調製したDNA溶液を酵素処理により環状一本鎖DNA化し、別にライブラリーよりPCR法で調製したビオチン化DNAとハイブリダイズさせ、ビオチン化DNAとハイブリダイズしたものを取り除き、残った環状一本鎖DNAライブラリーを二本鎖化し、大腸菌を形質転換するか、あるいは、cDNAライブラリーより調製したDNA溶液を酵素処理により環状一本鎖DNA化し、別にライブラリーより調製した相補的なビオチン化RNAとハイブリダイズさせ、ビオチン化RNAとハイブリダイズしたものを取り除き、残った環状一本鎖DNAライブラリーを二本鎖化し、大腸菌を形質転換する方法、のいずれによつて得ることができる。なお、DNA溶液の環状一本鎖化、DNAのビオチン化、ハイブリダイゼーション、及び環状一本鎖ライブラリーの二本鎖化、大腸菌の形質転換は、当該技術分野で既知の方法に従い、当業者が入手可能な酵素や培地等を用いて行うことができる。

作成した標準化腎臓cDNAライブラリーより、大腸菌のクローンを無作為に4,224個単離した。これらのクローン全部の部分塩基配列決定を行い、アレイにスポットしたユニークなクローンの数を見積もったところ2,878クローンであつた。

### 3) プローブの調製

上記1) の成長因子処理した細胞からそれぞれ $2\mu\text{g}$ のpoly(A)+ RNAよりCy3-またはCy5-と結合したdUTP (アマシャムファルマシア社) を基質に、Superscript II reverse transcriptase (ライフテクノロジー社)を用い、供給者指定の条件下で37°C、30分間、逆転写反応を行った。その後、ラベルしたプローブを5 Microconフィルター (ミリポア社) で濃縮し、 $10\mu\text{l}$ のハイブリダイゼーション液 (0.3% SDS、 $20\mu\text{g}$  poly(A)+ DNA、 $20\mu\text{g}$  酵母tRNAを含む $3.4\times\text{SSC}$ ) で希釈した後マイクロアレイとのハイブリダイゼーションに用いた。

### 4) ハイブリダイゼーションとマイクロアレイの蛍光強度の測定

c DNAマイクロアレイに対し、上記3) の方法で調製した、ラベルしたプローブを用いて65°Cで一晩ハイブリダイゼーションを行った。洗浄はカバーガラスをはずした後、 $2\times\text{SSC}$  (0.5% SDSを含む) を用いて室温で5分間2回行い、引き続いて $0.2\times\text{SSC}$  (0.5% SDSを含む) を用いて40°Cで3分間、最後に $0.2\times\text{SSC}$ を用いて3分間洗浄を行った。低速遠心によりスライドガラスを乾燥させた後、スキャナアレイ5000 (ピーエム機器) で蛍光強度を測定し、Array Gauge (富士フィルム) を用いて解析を行った。

### 5) 半定量的RT-PCR

半定量的RT-PCRは、RT-PCRと同様にして行うが、内部標準を設け、PCR反応で産物が対数的に増えるサイクル数をあらかじめ決めておいてその範囲で增幅反応20を行う点において異なる。

mRNAは上記と同様の条件下で37°C、30分間、逆転写反応を行い、希釈した後、プラチナPCRスーパーMix (ライフテクノロジー社) を用いて、供給者指定の条件に従って行った。反応液の組成は、プラチナPCRスーパーMix 45 μl、錆型DNA 1 μl、プライマー 各 $10\mu\text{M}$ である。12から25 5サイクルの間でc DNA断片を增幅し、各反応において半定量的解析を行う対数期を決定した。PCRプライマーを報告されている配列 (GenBank) の配列情報に従って合成した。PCR産物は適当な制限酵素で消化し、増幅したPCR産物が目的のものと一致するかどうかの確認を行った。PCR産物の濃度解析は、画像解析ソフトMacBAS v. 2.51 (富士写真フィルム) を使用し、発現量が一定であ

るとされているRibosomal S9、 $\beta$ -アクチンおよびGAPDH遺伝子の発現量を同時に測定して、サンプルごとの操作由来の誤差を補正した。

使用したプライマーは、マウス及びラットのEdgファミリーの遺伝子の配列情報(GenBank)に従って合成した。各プライマーの配列を以下の表及び配列番号5 7～38に示す。

表 1

起源	プライマー	配列番号
マウス	FW 5-ATC AGC TCG CTG TCT AGC RV 5-TAG GAA GAA GAA TTG ACG	7 8
	FW 5-CTG CTG GCT ATT GCT ATC RV 5-AAC ACA GGA TCT GCC TGA	9 10
	FW 5-CTG ACC ATG ATC AAG ATG RV 5-GTT CTG AAA CGA CCT GTT	11 12
	FW 5-TTG CTA CCT GCA CAC TTC RV 5-CAC ATG CAG CAG AGA AGG	13 14
	FW 5-TGG AAT TGT CTG AAC CAG RV 5-TCA GAC CAC TGT GTT ACC	15 16
	FW 5-ATC GGT CTG TGC TGG CTA RV 5-CTA GGT GCT CGG GAC GCT	17 18
	FW 5-ATG AGT GTC ACT ATG ACA RV 5-GTT GCA GAG GCA ATT CCA	19 20
	FW 5-TAT GTG CTC TTC TGC GTG RV 5-TCA GTC TGT AGC ATC AGG	21 22
	FW 5-TGT TCA TTC TCA TCT GCT GC RV 5-TAT AGT GCT TGT GGT AGA GC	23 24
	FW 5-GCC ACA GAA TGG AAC ACA GT RV 5-CCA GAA CTA TGC CGA GAC AT	25 26
	FW 5-TCA TTG GCA ACT TGG CTC TC RV 5-CCA GCA TGA TGA ACC ACT GA	27 28
	FW 5-TGC TGA CCA ATC TGC TGG T RV 5-AGT AGG AAG ACA AGC AGG CT	29 30
	FW 5-GCC ATC GCC AAG GTC AAG CT RV 5-ACT GTG TTG CCC TCC AGA AA	31 32
	FW 5-GGC ATG GAC TGG ATC CTG RV 5-CAG ACT CAC TGG ATC TGG AT	33 34
	FW 5-TGA GTG TCA CTA TGA CAA GC RV 5-ATG TTG CAG AGG CAA TTC CA	35 36
	FW 5-TGC TCT TCT CGG TGC TGG RV 5-AAA CTG TTG GAG GAG TCT TG	37 38

(i) c DNAアレイを用いる HIGAモデルマウスの腎臓における遺伝子発現変化の解析

HIGAマウスと、年齢および性別が等しいコントロールddYマウスの腎臓から調製したmRNAを用いて、上記2)～4に記載の方法に従ってハイブリダイ

5 ゼーションを行い、マイクロアレイの蛍光光度を測定した。

解析の結果、図3に示すようにHIGAマウスの遺伝子発現パターンは、コントロールに比べて25週齢よりも6週齢において散乱の程度が大きいことが分かった。これは、組織学的な変化が観察される前に多くの遺伝子が差動的に発現

10 (differential gene expression) することを表している。6週齢と25週齢のHIGAマウス腎臓で差動的に発現するcDNAクローンをそれぞれ553クローン、156クローンづつ同定し、それらの70%以上は発現が増加するものであることを見出した。これら差動的に発現する遺伝子をデータベースにより調べたところ、92クローン及び22クローン（それぞれ6週齢、25週齢）がGenBankのESTとのみマッチするものであり、65クローン及び28クローンはGenBankでマッチするものがなかった。差動的に発現する遺伝子のうち、成長因子やその受容体及び細胞増殖に関連する分子の発現が増加しており、その発現プロファイルは、HIGAマウス腎臓における異常な細胞増殖に対する自己防御のメカニズムを反映していると考えられた（表2参照）。

表 2

## 腎臓標準化マイクロアレイを用いる遺伝子発現分析

遺伝子	相対的な発現 (HIGA/ddy)	
	6週齢	25週齢
<b>細胞周期、増殖</b>		
抗増殖性抗体 (TAPA) の標的	1.7	1.0
Growth arrest specific 1 (Gas1)	1.5	1.5
サイクリンD1	3.4	1.8
サイクリンG	1.8	0.9
抗増殖性因子(BTG1)	1.6	1.1
<b>増殖因子</b>		
血小板誘導成長因子A鎖 (PDGF-A)	1.3	1.1
グリア誘導神経栄養成長因子 (GDNF)	1.6	1.1
血管内皮成長因子(VEGF)	1.4	1.4
表皮成長因子 (EGF)	1.3	0.9
<b>成長因子受容体</b>		
線維芽細胞成長因子受容体2(FGFR2)	2.7	1.2
線維芽細胞成長因子受容体3(FGFR3)	1.0	1.5
アルファ血小板由来成長因子受容体(PDGFR-A)	1.5	1.7
VEGF受容体-2 (FLK-1)	1.4	1.6
<b>G 蛋白質結合レセプター</b>		
H218, 内皮分化遺伝子5(edg-5)	3.0	1.7
ロイコトリエンB4受容体(BLT)	1.6	1.2
5-ヒドロキシトリプタミン受容体(5HT-2)	1.4	1.1

5

関連する遺伝子群の1つは成長因子やその受容体でありメサンギウム細胞において強力な分裂促進効果を持つと報告されているものであり、もう一つの遺伝子群はG P C R (G蛋白質共役型受容体)であり、化学誘引性の脂質メディエーターであるロイコトリエンB<sub>4</sub>に対する受容体、5-ヒドロキシトリプタミン受容体(5HT-2)、S P P受容体であるE d g -5が含まれる。

発現データから得られる特定のパターンの数々は、I G A Nにおいて起こって

いる反応を反映しているものと考えられる。特に、細胞周期や細胞増殖の制御に関与する幾つかの遺伝子の発現変化が多く見られた。それらの多くは成長因子やその受容体であり I G A N 患者の腎臓において P D G F 及び P D G F 受容体の発現の上昇が見られるという臨床における知見と一致する。そして、マイクロアレイの結果をもとに P D G F 誘導によるメサンギウム細胞の増殖において顕著な E d g - 5 のアップレギュレーションが見られることを見出した。これらのことを見出すると、疾患の進行を促進する新規の P D G F / P D G F 受容体- E d g - 5 パスウェイを想定することができる。(図 1)

(ii) R T - P C R による E d g ファミリーの発現レベルの解析

E d g ファミリーの 8 つのサブタイプの発現レベルについて、サブタイプ特異的プライマーを用いた R T - P C R により解析を行った。R T - P C R は、上記表 1 に記載の PCT プライマーを用い、5) に記載の半定量的 R T - P C R と同様の条件下で行った。

結果を図 4 に示す。図 4 において、(A) は 6 週齢 (6 W) 及び 25 週齢 (25 W) の H I G A マウスと、該 H I G A マウスと年齢及び性別が等しい d d y マウスの腎臓から調製した m R N A を用いて E d g ファミリーの 8 つのサブタイプの発現レベルについて解析した結果を示す写真の模写図である。(B) は (A) に示した結果を H I G A / d d y の比で表したグラフである。(A) から、E d g - 8 を除くすべての E d g ファミリーメンバーが腎臓において検出可能であることが分かる。また、(B) から、6 週齢では幾つかの E d g サブタイプが d d y に比べ H I G A マウスで上方制御されていること、特に E d g - 5 と E d g - 6 の発現が H I G A マウスでは d d y マウスの数倍まで上昇していることが明らかである。一方、25 週齢ではそれぞれの E d g サブタイプの発現について十分な変化は見られない。これは、E d g ファミリーの上方制御が I G A N の早い段階で起こっていることを示唆している。なお、E d g - 6 は血小板における主要な S P P 受容体サブタイプであることから、上記 6 週目での上方制御には、実験で用いた m R N A が浸潤した血小板由来の E d g - 6 転写物が関与していると考えられる。これは、血小板で特異的に発現することが知られている血小板因子 4 (platelet factor 4) の m R N A も同様に増幅されたことによって裏付けられた。

## (iii) マウス腎臓由来のE d g ファミリーの半定量的R T - P C Rによる解析

上記の方法でH I G Aマウスの腎臓由来のm R N Aについて半定量的R T - P C Rを行った。その結果、表2に示すように、P D G F、b F G F、E G Fをコードする遺伝子も、それぞれの受容体と同様に発現が増加していることが確認された。  
5 また、この実験によりそれぞれの分子の遺伝子発現についても詳細に得ることができ、このR T - P C Rで得られた遺伝子発現パターン変化は全体的にマイクロアレイの結果と高い相関を示すものであった。

## (iv) P D G F誘導増殖性ラットメサンギウム培養細胞におけるE d g - 5の上方制御

P D G F-B Bのような成長因子は、メサンギウム細胞においてスフィンゴミエリナーゼやセラミナーゼを活性化し、その結果、新規のS P Pが合成されると考えられている (J Biol Chem 1995 Oct 6;270(40):23305-9 Differential regulation of sphingomyelinase and ceramidase activities by growth factors and cytokines. Implication for cellular proliferation and differentiation Coroneos E, Martinez M, McKenna S, Kester M)。上記のH I G Aマウス腎臓におけるP D G FとP D G F受容体の発現上昇は、P D G Fがメサンギウム細胞においてS P Pの合成だけではなくS P P受容体の発現にも影響を及ぼしていることを示唆している。そこで、ラットのメサンギウム培養細胞を用いてE d g 遺伝子の発現に対する成長因子の効果について解析した。

20 上記1) の方法に従いラット腎糸球体のメサンギウム細胞の培養を行った。即ち、10% (v/v) ウシ胎児血清 (FCS) を添加したRPMI1640を用いて培養した。6穴プレートで培養したメサンギウム細胞 ( $5 \times 10^4$  cells/ウェル) に16-24時間スタベーションをかけ、成長因子を添加した無血清のRPMI1640により処理を行った。S P P処理の際には、0.4% FAF-BSAを含む無血清のRPMI1640を用いた。各処理の2、4、8、26時間後にXTT assay kit (ロッシェ・ダイアグノティクス社) を用いてメサンギウム細胞の増殖を測定した。また、各処理の0.5、2、4、8、26時間後にIsogen (ニッポンジーン) を用いて total RNAの単離を行った。

具体的には、10 ng/ml P D G F-B B、10 ng/ml b F G F、20 ng/ml E G Fを加えて、0.5、2、4及び8時間培養して刺激した。その結果、表3に示すように

P D G F - B B による 2 時間刺激の場合に、E d g - 5 の発現が誘導された。

表 3

成長因子による E d g の誘導			
Edgサブタイプ	PDGF-BB (10 ng/ml)	bFGF (10 ng/ml)	EGF (20 ng/ml)
Edg-1	1.6±0.38	0.8±0.35	0.9±0.06
Edg-2	1.3±0.16	1.4±0.11	1.0±0.24
Edg-3	1.1±0.21	1.1±0.24	1.3±0.32
Edg-5	2.4±0.52*	1.5±0.15	1.5±0.45

メサンギウム細胞を記載の成長因子で2時間刺激した。発現の割合  $\beta$  アクチンで標準化した。数値は、それぞれ3回行った独立した3つの実験の平均±S. E. M. で表した。\*P<0.05 (対コントロール)

なお、高濃度の P D G F (40ng/ml) の 2 時間の刺激では、中程度の E d g - 1、E d g - 3 のアップレギュレーション (2 時間で、1.9 ± 0.43- 及び 1.7 ± 0.45- 倍、n = 3) 及び十分な E d g - 5 のアップレギュレーション (2 時間で、1.8 ± 0.14- 倍、P < 0.05、n = 3) が誘導された。しかし、成長因子による刺激の効果は、E d g - 4、E d g - 6、E d g - 7 の発現については検出できなかった。

次いで、種々の成長因子の細胞増殖における効果についても研究を行った。図 5 に示すように P D G F - B B (10 ng/ml)、b F G F (10 ng/ml) のメサンギウム細胞増殖における効果は E G F (20 ng/ml) よりも顕著であった (図中、黒四角は b F G F 、黒三角は P D G F - B B 、黒丸は E G F を表す)。

また、既にメサンギウム細胞増殖に関与していると報告されている最初期遺伝子の発現についても実験を行ったところ、c-fos と early growth response gene-1 は、これら全ての成長因子によって 0.5 時間刺激後アップレギュレートを示し、特に P D G F - B B の効果が際立っていた。

上記と同様に、スタベーションをかけた後、成長因子の代りに S P P を添加した RPMI1640 を用い、同様に実験した。その結果、10  $\mu$  l の濃度で添加したとき S P P はメサンギウム細胞の増殖及び最初期遺伝子の発現に大きな効果を及ぼした

(26時間で1.2倍、 $P < 0.05$ 、 $n = 3$ )。しかしE dg ファミリー受容体の発現におけるSPPの効果については検出することができなかった。

以上のように、マイクロアレイ及びRT-PCRの解析によりHIGAマウス腎臓において、メサンギウム細胞の増殖が観察される前にE dg ファミリー、特にE dg -5が発現の増加を示すことが明らかになった。現在まで、SPP (E dg -1, 3, 5, 6, 8)とリゾフォスファチジン酸 (E dg -2, 4, 7)に高い親和性を持つ受容体である8つのGPCRがE dg ファミリーとして同定されている。上記の結果は、SPPはE dg -1、E dg -3、E dg -5を経てメサンギウム細胞の増殖を誘導する。加えて増殖性メサンギウム細胞において、PDGFがこれらのE dg 受容体特にE dg -5をアップレギュレートしていることを初めて示すものである。E dg -5は、ラットの褐色細胞種PC12細胞においてSPP誘導による神經突起の後退や細胞の円唇化を仲介すること、ラットHTC4肝細胞腫細胞において細胞増殖及び抗アポトーシス作用を示すことが報告されているが、E dg -5のIGANにおける役割については未だ知られていない。

HIGAマウス、DNAマイクロアレイ及びRT-PCRを用いた、PDGF誘導下でのE dg -5アップレギュレーションに関連する一連のシグナル伝達機序を図1に模式的に示した。即ち、PDGFで刺激するとメサンギウム細胞はさらにPDGFを生産・放出し、オートクライイン及びパラクライインの機構によって細胞表面のPDGF受容体の発現が増加する。そして、PDGFはメサンギウム細胞のスフィンゴミエリナーゼとセラミダーゼを活性化し、その結果SPPの合成が増加する。一方、SPPは活性化した若しくは凝集性の血小板からも放出される。図1に示すように、SPPはオートクライインでまたは分子内のセカンドメッセンジャーとして働くことにより、メサンギウム細胞の増殖を引き起こすと考えられる。リガンドであるSPPとその受容体E dg -1、E dg -3、E dg -5 (特にE dg -5) の合成量は相乗的に増加しうる。HIGAマウス腎臓で観察されたPDGF/PDGF受容体とE dg -5の発現の増大は、細胞増殖活性につながる成長因子シグナルとリンクするカスケードの増幅のために、PDGF-SPP-E dg パスウェイが正のフィードバックループ中で作用している可能性を示唆している。実験結果はまた、メサンギウム細胞からのSPPはE dg -5の

発現上昇を通して血小板を活性化し、血小板からのS P Pの分泌も促進するというように、I G A Nの進行中止のフィードバックループ内で次々に作用が起こることを示唆している。そして、これらの悪循環のすべてがH I G Aマウス腎臓において作動していることが増殖性糸球体腎炎の治療困難性の一因であると考えられる。

5

このように、上記の実験結果は、E d g - 5とリガンド（S P P）との結合阻害物質（E d g - 5アンタゴニスト）が、増殖性糸球体腎炎、特にI G A Nの予防・治療薬の開発に重要な役割を果たすことを示すものである。

#### 実施例2 マイクロフィジオメーターによるスクリーニング

10

##### ( i ) ほ乳類培養細胞での発現

E d g - 5受容体を、ヒト胎児性腎臓由来細胞（HEK 2 9 3）あるいは、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞（CHO）で発現させる。

15

高頻度に受容体を発現させるために、配列番号1に記載のヌクレオチド配列のうち、5'あるいは、3'の非転写領域を全て除き、真核細胞の発現ベクターである、pC I - N E O（プロメガ株式会社）又はpCDNA3. 1（Invitrogen）に連結する。

20

当該遺伝子を連結したpCI-Neoあるいは、pcDNA3. 1をLipofectamine Plus Reagent（Life Technologies社製）を用い、添付文書の条件に従って培養細胞、HEK293あるいはCHOに対する形質導入を行い、以後の検討に用いる。ベクターのみを導入したHEK293あるいは、CHOをネガティブコントロールとして用いる。

25

また、形質導入細胞を選択する場合には、細胞を400mg/mlのG418を含む細胞培養用培地中で3週間選択培養を行なう。G 4 1 8耐性の2 4 クローンを選択し、実施例1に記載のごとく、R T - P C R法でE d g - 5受容体遺伝子を安定に発現している細胞を選択する。選択した細胞を9 6 穴の細胞培養用プレートを用いて1個の細胞より、増殖させたクローンを再選択して、以後の検討に用いる。ベクターのみを導入したHEK293あるいは、CHOを同時に作製し、ネガティブコントロールとして用いる。

##### ( ii ) マイクロフィジオメーター（サイトセンサー）によるスクリーニング

種々の細胞のシグナル応答に対応して、細胞より、微少な、酸性物質が排出さ

れる。これは、細胞内のシグナリングプロセスを活性化するために必要な代謝活性の増大によるものである。サイトセンサー（モレキュラー・デバイス社）は、  
5 生細胞の代謝変化で発生する細胞外液の酸性化率（pH変化）を、シリコンセンサーチップを用いて検出することで細胞のシグナル応答を測定することができる。  
マイクロフィジオメーターとしてサイトセンサーを用いて、細胞表面に発現させ  
た受容体への、リガンド結合による受容体の活性化を検出する。

E d g - 5 受容体の天然のリガンドであるスフィンゴシン 1-リン酸（S P P）と同時に種々の化合物を細胞外液に加えることによって、S P Pの活性を阻害するアンタゴニストをスクリーニングすることができる。

10 実施例 3 C a <sup>2+</sup>イオン濃度変化によるスクリーニング

( i ) ほ乳類培養細胞での発現

E d g - 5 受容体遺伝子を安定に発現している細胞の選択は、「マイクロフィジオメーターによるスクリーニング」の(i)で記載した方法と同様にして行った。

15 ( i i ) F L I P R システムによるスクリーニング

受容体を安定に発現する細胞を、96穴のプレートに  $5.5 \times 10^4$  / ウエルの密度で培養し、スタンダード・バッファー (130 mM NaCl、2 mM CaCl<sub>2</sub>、5 mM KCl、10 mM グルコース、0.45 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、8 mM MgSO<sub>4</sub>、4.2 mM NaHCO<sub>3</sub>、20 mM HEPES、10 μM プロペネシド) 中で、Fluo-3 AM (Molecular Probes社) を取り込ませるために、0.1%牛胎児血清存在下で、37°Cで1時間インキュベートした後、スタンダード・バッファーで洗浄した。S P Pを加えることによるC a <sup>2+</sup>イオン濃度の一時的な変化は、F L I P R システム (Fluorometric Imaging Plate Reader : モレキュラー・デバイス社) を用いて、96穴のプレートを488 nmで測定することによって知ることができる。

従って、S I P と同時に種々の化合物を細胞外液中に加えることによって、S P Pの活性を阻害するアンタゴニストをスクリーニングすることができる。

本発明方法によれば、E d g - 5受容体に対する拮抗作用を含むE d g - 5の活性化の抑制作用に基いて、増殖性糸球体腎炎、特にI G A Nの予防・治療に有用な物質を効率よくスクリーニングし、該疾患の新規な治療法の開発に大いに貢献しうる。

## 請求の範囲

1. 増殖性糸球体腎炎の予防・治療用薬をスクリーニングする方法であつて、E  
d g - 5 の活性化を抑制する作用に基くことを特徴とする方法。  
5 2. E d g - 5 のリガンドと、E d g - 5 又はそれと同等のポリペプチドとの結合  
を阻害する作用に基くことを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。  
3. E d g - 5 又はそれと同等のポリペプチドが以下の群から選択される、請求  
項 2 に記載の方法：
  - ① 配列表の配列番号 2、4 若しくは 6 に記載のアミノ酸配列で示されるポリ  
10 ペプチド又はその断片であつて、E d g - 5 のリガンドとの結合活性を有するポ  
リペプチド、
  - ② 配列表の配列番号 2、4 若しくは 6 に記載のアミノ酸配列と 80% 以上の  
相同性を有するアミノ酸配列で示されるポリペプチド又はその断片であつて、E  
d g - 5 のリガンドとの結合活性を有するポリペプチド、  
15 ③ 配列表の配列番号 2、4 若しくは 6 に記載のアミノ酸配列において、1 個  
以上のアミノ酸の欠失、置換、付加若しくは挿入を有するアミノ酸で示されるポ  
リペプチド又はその断片であつて、E d g - 5 のリガンドとの結合活性を有する  
ポリペプチド、及び  
20 ④ 前記①～③のいずれかに記載のポリペプチドを含有するポリペプチド。
4. 請求項 2 又は 3 に記載のポリペプチドを含有する細胞、該細胞由来の細胞膜  
画分若しくは単離された蛋白質を用いる、請求項 2 又は 3 に記載の方法。  
25 5. 前記細胞が、請求項 2 又は 3 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレ  
オチドを導入され、該ポリヌクレオチドを発現している細胞である、請求項 4 に  
記載の方法。
6. 前記ポリヌクレオチドが以下の群から選択される、請求項 5 に記載の方法：
  - ① 配列表の配列番号 1、3 若しくは 5 に記載の塩基配列で示されるポリヌク  
レオチド；  
20 ② 配列表の配列番号 1、3 若しくは 5 に記載の塩基配列を有するポリヌクレ  
オチドに対してその全長にわたり少なくとも 80% の同一性を有するポリヌクレ

オチド；

③ 配列表の配列番号1、3若しくは5に記載の塩基配列と縮重を介して異なる塩基配列で示されるポリヌクレオチド；及び

④ 上記①～③に記載のポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイ  
5 ブリダイズしうるポリヌクレオチド。

7.  $E_{d\ g-5}$ 又はそれと同等のポリペプチドとリガンドとを接触させた場合と、 $E_{d\ g-5}$ 又はそれと同等のポリペプチド、リガンドおよび試験物質とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする、請求項2～6のいずれか1項に記載の方法。

10. 比較を、 $E_{d\ g-5}$ 又はそれと同等のポリペプチドを含有する細胞に対するリガンドの刺激活性（シグナル伝達作用）の変化、 $E_{d\ g-5}$ 又はそれと同等のポリペプチドに対するリガンドの結合量の変化、または細胞内での $E_{d\ g-5}$ の発現・産生量の変化に基づいて行なうことを特徴とする、請求項2～7のいずれか1項に記載の方法。

15.  $E_{d\ g-5}$ を発現しうる細胞における $E_{d\ g-5}$ の産生量又はmRNAの量を定量することを特徴とする、請求項1に記載の方法。

10. 配列番号2、4若しくは6に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又はその一部を用いて $E_{d\ g-5}$ のmRNAを定量することを特徴とする、請求項9に記載の方法。

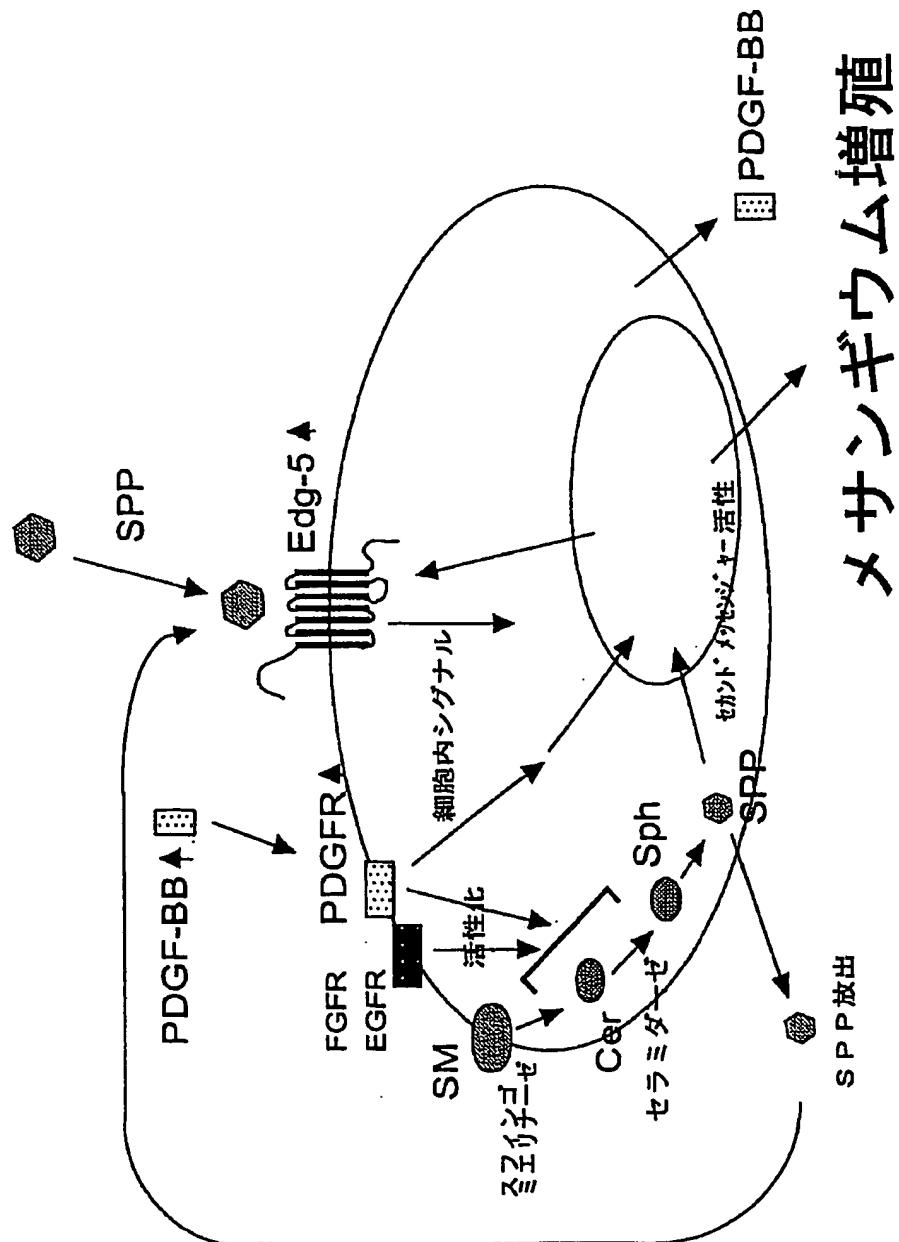
20. 11. 請求項1～10のいずれか1項に記載の方法を実施するためのキット。

12. 請求項1～10のいずれか1項に記載の方法又は請求項11に記載のキットを用いて得られる増殖性糸球体腎炎の予防・治療薬。

25. 13. 請求項1～10のいずれか1項に記載の方法又は請求項11に記載のキットを用いて、 $E_{d\ g-5}$ のリガンドと、 $E_{d\ g-5}$ 又はそれと同等のポリペプチドとの結合を阻害するか、 $E_{d\ g-5}$ の発現・産生を阻害する作用を有する物質をスクリーニングする工程、前記物質の増殖性糸球体腎炎に対する予防又は治療効果を確認する工程、及び前記工程で増殖性糸球体腎炎に対する予防又は治療効果が確認された物質を有効成分として含有する増殖性糸球体腎炎の予防・治療薬の製造方法。

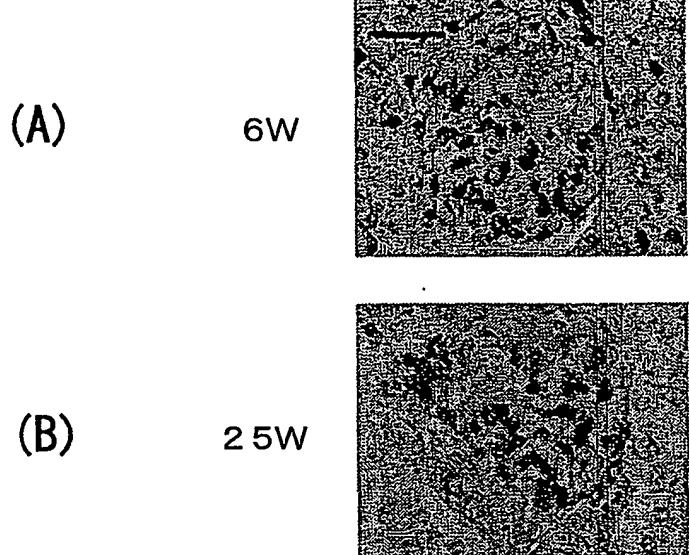
1 / 5

図 1



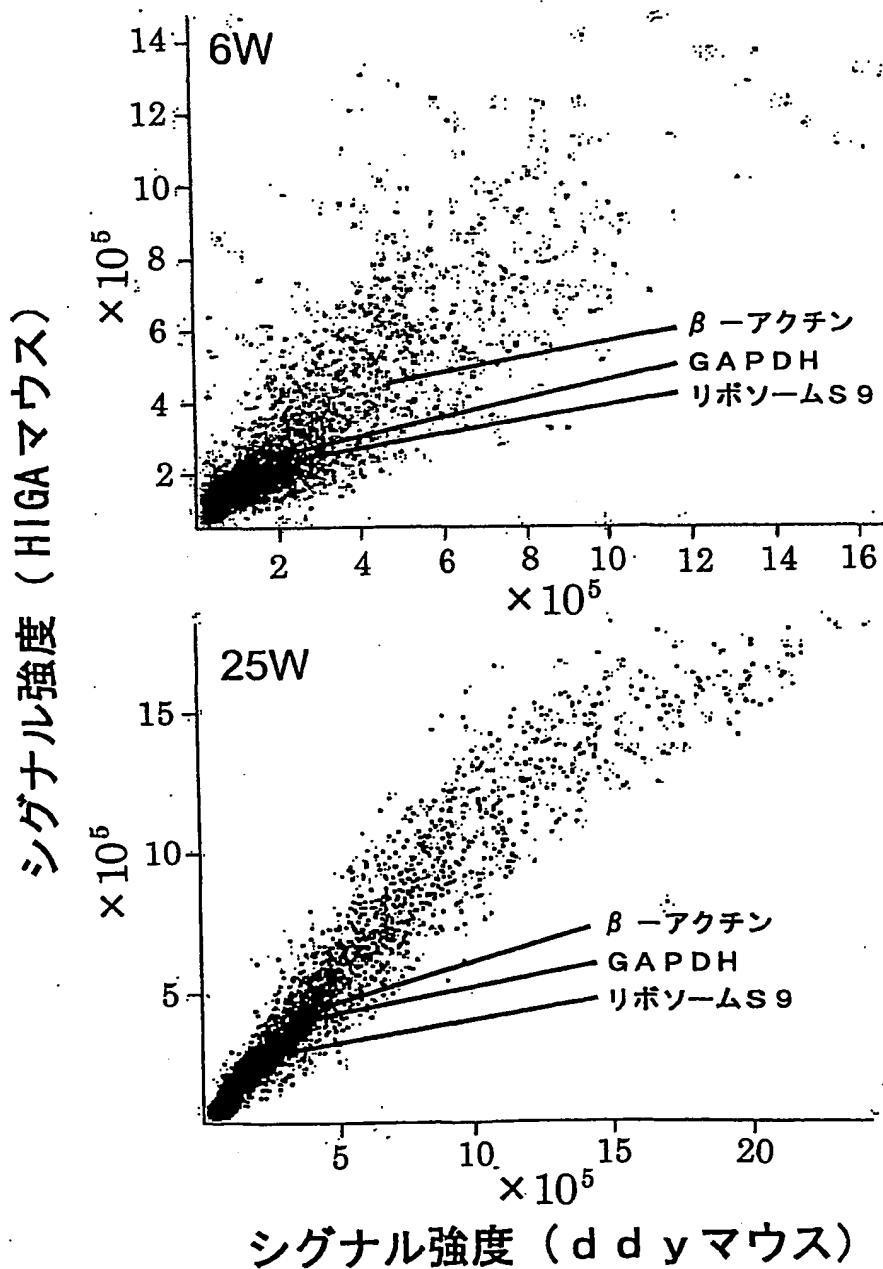
2 / 5

図 2



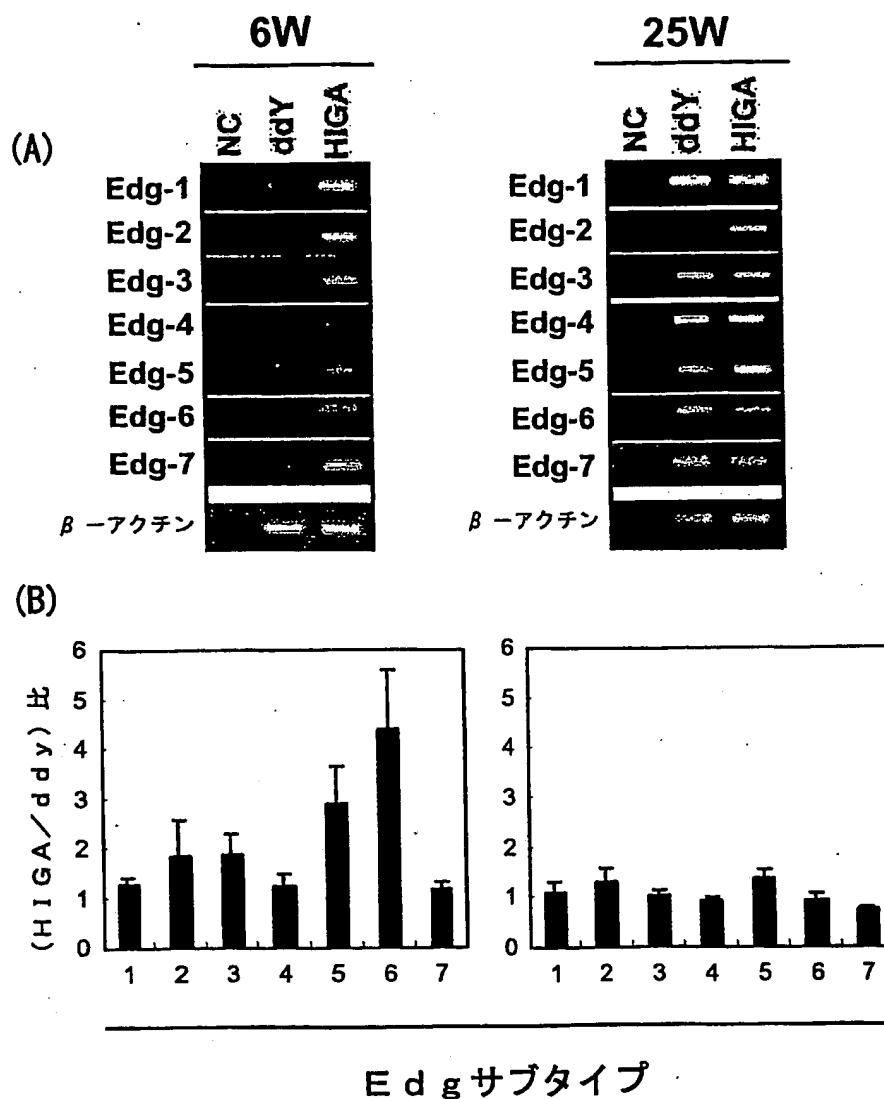
3 / 5

図 3



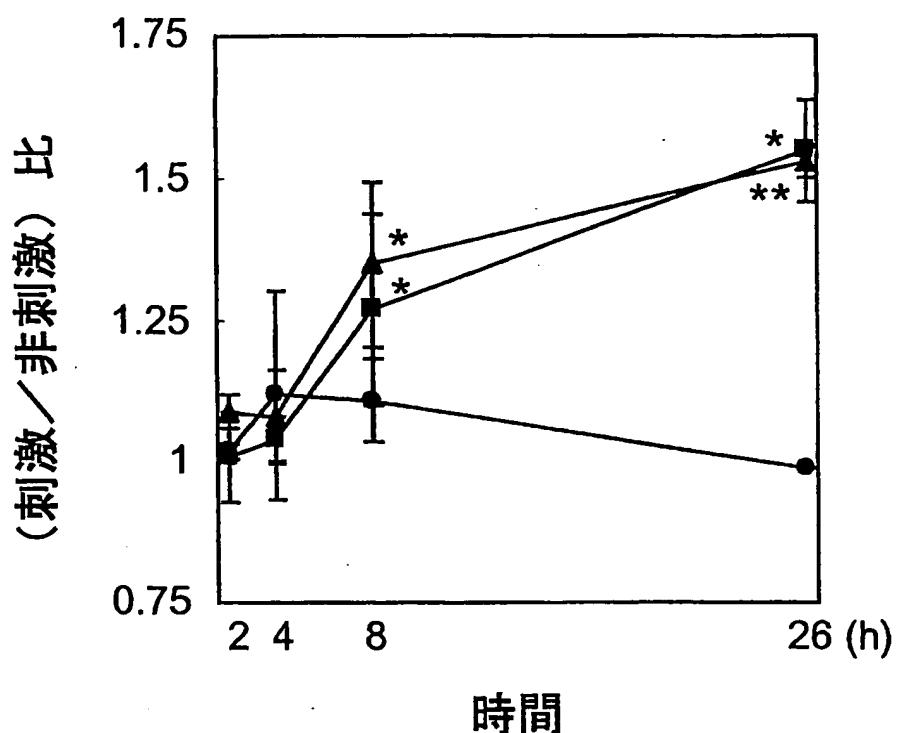
4 / 5

図 4



5 / 5

図 5



1 /15

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Nippon Shinyaku Co. Ltd.

&lt;110&gt; The Japan Human Sciences Foundation

<120> Methods of screening prophylactic or therapeutic drugs  
for proliferative glomerulonephritis

&lt;130&gt; 175336

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 38

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1062

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

atggcagct tttactcgga gtacctaaca cccaaacaagg tccaggaaca ctataattat 60  
accaaggaga cgctggaaac gcaggagacg acctccgc aggtggcctc ggcatttc 120  
gtcatctct gtgtcgccat ttgttgtgaa aaccccttctgg tgctcattgc ggtggcccg 180  
aacagcaagt tccactcgcc aatgtaccgt ttcttggca acctggccgc ctccgatcta 240  
ctggcaggcg tggccttctgt agccaataacc ttgtctctgt gctctgtcac gctgaggctg 300  
acgcctgtgc agtgggttgc cggggaggcc tctgcctcca tcacgccttc ggcctgtc 360  
ttcagcctcc tggccatcgcc cattgagcgcc cacgtggca ttgccaagggt caagctgtat 420  
ggcagcgaca agagctgcgc catgtttctgt ctcatcgcccc cctcgtggct catctcgctg 480  
gtcctcggtg gcctgcccatt ccttggctgg aactgcctgg gccacctcgaa ggcctgtcc 540  
actgtccctgc ctctctacgc caagcattat gtgtgtgcg tggtgaccat cttctccatc 600  
atcctgttgg ccatgtggc cctgtacgtg cgcacatctact gcgtggccgc ctcaaggccac 660  
gctgacatgg ccgcggccgaa gacgttagcc ctgtcaaga cgggtcaccat cgtgttaggc 720  
gtctttatcg tctgtggctt gcccgcctt agcatccctt ttctggacta tgcctgtccc 780  
gtccactcc tggccatctt ctacaaaagcc cactactttt tcgcgcgtctc caccctgaat 840  
tccctgtca accccgtcat ctacacgtgg cgcagccggg acctgcggcg ggaggtgc 900  
cggccgctgc agtgcgtggcg gcccgggtt ggggtgcaag gacggaggcg ggtcgggacc 960  
ccggccacc acctcctgcc actccgcagg tccagctccc tggagagggg catgcacatg 1020  
ccacacgtcac ccacgtttctt ggagggcaac acgggtgtct ga 1062

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 353

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

2 /15

&lt;400&gt; 2

Met Gly Ser Leu Tyr Ser Glu Tyr Leu Asn Pro Asn Lys Val Gin Glu  
1 5 10 15  
His Tyr Asn Tyr Thr Lys Glu Thr Leu Glu Thr Gln Glu Thr Thr Ser  
20 25 30  
Arg Gln Val Ala Ser Ala Phe Ile Val Ile Leu Cys Cys Ala Ile Val  
35 40 45  
Val Glu Asn Leu Leu Val Leu Ile Ala Val Ala Arg Asn Ser Lys Phe  
50 55 60  
His Ser Ala Met Tyr Leu Phe Leu Gly Asn Leu Ala Ala Ser Asp Leu  
65 70 75 80  
Leu Ala Gly Val Ala Phe Val Ala Asn Thr Leu Leu Ser Gly Ser Val  
85 90 95  
Thr Leu Arg Leu Thr Pro Val Gln Trp Phe Ala Arg Glu Gly Ser Ala  
100 105 110  
Ser Ile Thr Leu Ser Ala Ser Val Phe Ser Leu Leu Ala Ile Ala Ile  
115 120 125  
Glu Arg His Val Ala Ile Ala Lys Val Lys Leu Tyr Gly Ser Asp Lys  
130 135 140  
Ser Cys Arg Met Leu Leu Leu Ile Gly Ala Ser Trp Leu Ile Ser Leu  
145 150 155 160  
Val Leu Gly Gly Leu Pro Ile Leu Gly Trp Asn Cys Leu Gly His Leu  
165 170 175  
Glu Ala Cys Ser Thr Val Leu Pro Leu Tyr Ala Lys His Tyr Val Leu  
180 185 190  
Cys Val Val Thr Ile Phe Ser Ile Ile Leu Leu Ala Ile Val Ala Leu  
195 200 205  
Tyr Val Arg Ile Tyr Cys Val Val Arg Ser Ser His Ala Asp Met Ala  
210 215 220  
Ala Pro Gln Thr Leu Ala Leu Leu Lys Thr Val Thr Ile Val Leu Gly  
225 230 235 240  
Val Phe Ile Val Cys Trp Leu Pro Ala Phe Ser Ile Leu Leu Leu Asp  
245 250 255  
Tyr Ala Cys Pro Val His Ser Cys Pro Ile Leu Tyr Lys Ala His Tyr  
260 265 270  
Phe Phe Ala Val Ser Thr Leu Asn Ser Leu Leu Asn Pro Val Ile Tyr  
275 280 285  
Thr Trp Arg Ser Arg Asp Leu Arg Arg Glu Val Leu Arg Pro Leu Gln  
290 295 300  
Cys Trp Arg Pro Gly Val Gly Val Gln Gly Arg Arg Arg Val Gly Thr  
305 310 315 320  
Pro Gly His His Leu Leu Pro Leu Arg Ser Ser Ser Ser Leu Glu Arg  
325 330 335  
Gly Met His Met Pro Thr Ser Pro Thr Phe Leu Glu Gly Asn Thr Val  
340 345 350  
Val

<210> 3  
<211> 1059  
<212> DNA  
<213> Mouse

<400> 3  
atggcgct tatactcaga gtaccta at cctgagaagg ttcttgc aca ctacaattac 60  
accaaggaga cgctggacat gcaggagacc acctccgc a ggtggc tc ggccttc atc 120  
atcatctgt gctgcgc at cggtggag aatcttctgg tgctcattgc agtggccagg 180  
aacagcaagt tccactcagc aatgtacctg ttcccttgca acctggcagc ctctgacctg 240  
ctggcaggcg tggcctcg tggccacacc ttactctc a ggcatgtcac tctgtcctta 300  
actccccgtgc a gttggttgc ccgagaggc tccgcctca tcacgc ttc cgcctcg 360  
tttagcctcc tggccatcgc catcgagaga caagtggcc tcgccaagg t caagctctac 420  
ggcagtgaca aaagtgcgc aatgctgtg ctcatcggg cctcttgct gatatcg 480  
attctgggtg gcttgc ccat cttggctgg aattgtctga accagctgga ggcctgtcc 540  
accgtgtgc ctctctatgc taagcactac gtgc tgc tggcatttc ctgcctcg 600  
atcttactgg ctatcg tggc tctgtacgtc cgaatctact ttgttagtccg ctccagccac 660  
gcggatgttg ctggcctca gacgc tagcc ctgc tcaaga cggtc accat cgtactgg 720  
gttttcatca tctgtggct gccc tttt agcatcc tcttagactc cacctgtcc 780  
gtccggcc t gccc tgc ctacaaagcc cactat tttt ttgc ttc cacccttaac 840  
tcactgctca atccgtcat ctatacg tgg cgtagccggg accttcggag ggagg tgc 900  
cggccctgc a gtcgtggc g gagg gaa ggagt gacgg gacgc a ggg tgg aaccc 960  
gtcaccgac tcctgcctc cccgac gtc agtccctgg agagaggcat gcatatgc 1020  
acatcaccga catttctgg a gggtaacaca gttgtctga 1059

<210> 4  
<211> 352  
<212> PRT  
<213> mouse

<400> 4  
 Met Gly Leu Tyr Ser Glu Tyr Leu Asn Pro Glu Lys Val Leu Glu  
     1             5                 10                 15  
 His Tyr Asn Tyr Thr Lys Glu Thr Leu Asp Met Gln Glu Thr Thr Ser  
     20             25                 30  
 Arg Lys Val Ala Ser Ala Phe Ile Ile Ile Leu Cys Cys Ala Ile Val  
     35             40                 45  
 Val Glu Asn Leu Leu Val Leu Ile Ala Val Ala Arg Asn Ser Lys Phe  
     50             55                 60  
 His Ser Ala Met Tyr Leu Phe Leu Gly Asn Leu Ala Ala Ser Asp Leu  
     65             70                 75                 80  
 Leu Ala Gly Val Ala Phe Val Ala Asn Thr Leu Leu Ser Gly His Val  
     85             90                 95  
 Thr Leu Ser Leu Thr Pro Val Gln Trp Phe Ala Arg Glu Val Ser Ala

4 /15

100	105	110
Phe Ile Thr Leu Ser Ala Ser Val Phe Ser	Leu Leu Ala Ile Ala Ile	
115	120	125
Glu Arg Gin Val Ala Leu Ala Lys Val Lys	Leu Tyr Gly Ser Asp Lys	
130	135	140
Ser Cys Arg Met Leu Met Leu Ile Gly Ala Ser	Trp Leu Ile Ser Leu	
145	150	155
Ile Leu Gly Gly Leu Pro Ile Leu Gly Trp Asn	Cys Leu Asn Gin Leu	
165	170	175
Glu Ala Cys Ser Thr Val Leu Pro Leu Tyr Ala	Lys His Tyr Val Leu	
180	185	190
Cys Val Val Thr Ile Phe Ser Val Ile Leu Leu	Ala Ile Val Ala Leu	
195	200	205
Tyr Val Arg Ile Tyr Phe Val Val Arg Ser Ser	His Ala Asp Val Ala	
210	215	220
Gly Pro Gin Thr Leu Ala Leu Leu Lys Thr Val	Thr Ile Val Leu Gly	
225	230	235
Val Phe Ile Ile Cys Trp Leu Pro Ala Phe Ser	Ile Leu Leu Leu Asp	
245	250	255
Ser Thr Cys Pro Val Arg Ala Cys Pro Val Leu	Tyr Lys Ala His Tyr	
260	265	270
Phe Phe Ala Phe Ala Thr Leu Asn Ser Leu Leu	Asn Pro Val Ile Tyr	
275	280	285
Thr Trp Arg Ser Arg Asp Leu Arg Arg Glu Val	Leu Arg Pro Leu Gln	
290	295	300
Cys Trp Arg Arg Gly Lys Gly Val Thr Gly Arg	Arg Gly Gly Asn Pro	
305	310	315
Gly His Arg Leu Leu Pro Leu Arg Ser Ser Ser	Leu Glu Arg Gly	
325	330	335
Met His Met Pro Thr Ser Pro Thr Phe Leu Glu	Gly Asn Thr Val Val	
340	345	350

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 2754

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;400&gt; 5

ccccctcgag cacagccaa acgtcacaaa gtcagccact ggctgtcccg gggcgcagac 60  
 gccaaggcca ctcaggccag ggcagggacc ctggccggcc tagccagtgc tcagtccat 120  
 ggcccccggcc ggccactgag ccccaccatg ggccgtttat actcagagta cctcaatcct 180  
 gagaagggttc aggaacacta caattacacc aaggagacgc tggacatgca ggagacgccc 240  
 tcccgcaagg tggcctccgc cttcatcatc atttatgtt gtgccatcggttggagaac 300  
 cttctggtgc taatcgcaagt ggccaggaac agcaagttcc actcagccat gtacctgttc 360  
 ctccggcaacc tggcagccctc cgacactgctg gcaggcgtgg ctttcgiggc caacaccc 420

5 /15

ctctccggac ctgtcaccct gtccttaact cccttgcagt gttttgcccg agagggttca 480  
 gccttcatca cgctctctgc ctgcgtcttc agcctcctgg ccaattgcacat cgagagacaa 540  
 gtggccatcg ccaaggtaa gctctacggc agtgacaaaa gctgtcaat gttgatgctc 600  
 attggggcct ctggctgtat atcgctgatt ctgggtggct tgcccatcct gggctggaaat 660  
 tgtctggacc atctggggc ttgcgtccact gtgcgtcccc tctatgciaa gcactatgtg 720  
 ctctgcgtgg tcaccatctt ctctgcacatc ttactggcta tcgtggcctt gtacgtccga 780  
 atctacttcg tagtccgctc aagccatgcg gacgttgctg gcctcagac gctggccctg 840  
 ctcaagacag tcaccatcg actgggttt ttcatcatctt gcgtggctgcc ggcttttagc 900  
 atcctctct tagactctac ctgtcccgtc cgggcgtgtc ctgcctctca caaagcccat 960  
 tatttccttgc cttcgcac cctcaactct ctgctcaacc ctgtcatctca tacatggcgt 1020  
 agccgggacc ttccggggaa ggtactgagg cccctgtgt gcgtggcggca ggggaaggga 1080  
 gcaacaggcgc gcagagggtgg gaaccttgtt caccgactcc tgccctccg cagctccagc 1140  
 tccctggaga gaggcttgca tatgcctaca tcgccaacat ttctggaggg caacacagt 1200  
 gtctgagggg aaatgtgaac tgatctgtaa ccaagccaca gagagagctc tgtggggaga 1260  
 gaccaggta cctcatcatg tccctcagtgc ccacaggctt ggaggaactg accacggctc 1320  
 ataggtcagg tggccaacgg aggcaactgac taatcagatt gtatgtactgt gactgtgggg 1380  
 accattaagg gtcttaggggg acagcaggtt ctaggtttagt gctagacatt tgccacttgg 1440  
 tacatagggt gtccggcatcc tgcgtgttct atctccagc ttcccggttc ctttcctgccc 1500  
 tccctccctt aaggccctct ctacatagcc cggcgtggctt agagcttgcgt gcgtggat 1560  
 ggctgacctg gacctcccag agatagatca actaactgtc tccgtgtgc tgggatttt 1620  
 aagccgtgtg ccccccacacc cggcctctgc caccttccag aagaatctt aggccactt 1680  
 ttggggaaaactctccca gaggaccata gccttcttcc ctgtctctctt gaggccctgaa 1740  
 tccacagctt ccccatttta tcaactgttgc ctcttccctt ttccctctgtt gttcagggga 1800  
 aaccactgtg ggggcaggga ggggtccctgg gatcccagt tttatgtca gatctactg 1860  
 agcacttgtt ttattggggaa gcagagagga atcagcttagt gcaatgttggg gcagatgtt 1920  
 aggagaattt gggcttcttg gtggaaaac tctagggggag gcgttgggtt ttccctggaaac 1980  
 ccagcccttc tcccccacgaa ctcttcacac cggcagccctt gagctggatg caaaggctgc 2040  
 ttcaatttg ttctttagt ttgtttgtt ttgtttgtt tttttaaat tgggacagga 2100  
 tctcacgtac cccaggctgg ctcccgactc actatgttgc caaggctggc ttggacttc 2160  
 tgaccctcctt gcctccgtt ctggagtgtca ggtattacaa ggggttacca ccaccaccac 2220  
 caccaccaac aacaacaaca acaacaacac ctgtcttgc aactatcatg aatgacatgg 2280  
 ttccacatagc ttgggtggc caaggacatc coggataactc ttatggcattc ttcccttgaag 2340  
 gactttgtca aatccgtgg agaagtagaa aatccaatac ggtacaaacg gtatgtatgt 2400  
 gtgtctgtgt atcagttgtgg ggtctgtgac ctccatccc agtgtgggtt ctgtctgacc 2460  
 tcttatgtgc acatccgtgt caagactgtt agagagatgg acgggggtgt gtgtgtttgt 2520  
 ggggtcttag ccatgtatcg gcctccctgg aattgttgc aatctctcc cacacacaga 2580  
 cacacacccctc cgccttaaaag aatgtgtga aagaaaaggc tgaggaaggg gagatttggg 2640  
 aggcaaggag ccagtcggga gtgtgtctcc ctcatacag ttcccgat gtccccccttg 2700  
 tgctggaaac ccagaacttgg gccaataaac agttcaattt ctcttggaaaa aaaa 2754

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 352

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;400&gt; 6

6 /15

Met Gly Gly Leu Tyr Ser Glu Tyr Leu Asn Pro Glu Lys Val Gln Glu  
1 5 10 15  
His Tyr Asn Tyr Thr Lys Glu Thr Leu Asp Met Gln Glu Thr Pro Ser  
20 25 30  
Arg Lys Val Ala Ser Ala Phe Ile Ile Ile Leu Cys Cys Ala Ile Val  
35 40 45  
Val Glu Asn Leu Leu Val Leu Ile Ala Val Ala Arg Asn Ser Lys Phe  
50 55 60  
His Ser Ala Met Tyr Leu Phe Leu Gly Asn Leu Ala Ala Ser Asp Leu  
65 70 75 80  
Leu Ala Gly Val Ala Phe Val Ala Asn Thr Leu Leu Ser Gly Pro Val  
85 90 95  
Thr Leu Ser Leu Thr Pro Leu Gln Trp Phe Ala Arg Glu Gly Ser Ala  
100 105 110  
Phe Ile Thr Leu Ser Ala Ser Val Phe Ser Leu Leu Ala Ile Ala Ile  
115 120 125  
Glu Arg Gln Val Ala Ile Ala Lys Val Lys Leu Tyr Gly Ser Asp Lys  
130 135 140  
Ser Cys Arg Met Leu Met Leu Ile Gly Ala Ser Trp Leu Ile Ser Leu  
145 150 155 160  
Ile Leu Gly Gly Leu Pro Ile Leu Gly Trp Asn Cys Leu Asp His Leu  
165 170 175  
Glu Ala Cys Ser Thr Val Leu Pro Leu Tyr Ala Lys His Tyr Val Leu  
180 185 190  
Cys Val Val Thr Ile Phe Ser Val Ile Leu Leu Ala Ile Val Ala Leu  
195 200 205  
Tyr Val Arg Ile Tyr Phe Val Val Arg Ser Ser His Ala Asp Val Ala  
210 215 220  
Gly Pro Gln Thr Leu Ala Leu Leu Lys Thr Val Thr Ile Val Leu Gly  
225 230 235 240  
Val Phe Ile Ile Cys Trp Leu Pro Ala Phe Ser Ile Leu Leu Leu Asp  
245 250 255  
Ser Thr Cys Pro Val Arg Ala Cys Pro Val Leu Tyr Lys Ala His Tyr  
260 265 270  
Phe Phe Ala Phe Ala Thr Leu Asn Ser Leu Leu Asn Pro Val Ile Tyr  
275 280 285  
Thr Trp Arg Ser Arg Asp Leu Arg Arg Glu Val Leu Arg Pro Leu Leu  
290 295 300  
Cys Trp Arg Gln Gly Lys Gly Ala Thr Gly Arg Arg Gly Gly Asn Pro  
305 310 315 320  
Gly His Arg Leu Leu Pro Leu Arg Ser Ser Ser Ser Leu Glu Arg Gly  
325 330 335  
Leu His Met Pro Thr Ser Pro Thr Phe Leu Glu Gly Asn Thr Val Val  
340 345 350

7 /15

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Forward primer  
for PCR

&lt;400&gt; 7

atcagctcgc tgtcttagc

18

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Reverse primer  
for PCR

&lt;400&gt; 8

taggaagaag aattgacg

18

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Forward primer  
for PCR

&lt;400&gt; 9

ctgctggcta ttgctatac

18

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Reverse primer  
for PCR

&lt;400&gt; 10

8 /15

aacacaggat ctgcctga 18

<210> 11  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Forward primer  
for PCR

<400> 11 18  
ctgaccatga tcaagatg

<210> 12  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Reverse primer  
for PCR

<400> 12 18  
gttctgaaac gacctgtt

<210> 13  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Forward primer  
for PCR

<400> 13 18  
ttgctacctg cacacttc

<210> 14  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Reverse primer  
for PCR

9 /15

<400> 14  
cacatgcagc agagaagg 18  
  
<210> 15  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Forward primer  
for PCR  
  
<400> 15  
tggaatttgtc tgaaccag 18  
  
<210> 16  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Reverse primer  
for PCR  
  
<400> 16  
tcagaccact gtgttacc 18  
  
<210> 17  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Forward primer  
for PCR  
  
<400> 17  
atcggtctgt gctggcta 18  
  
<210> 18  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>

10/15

<223> Description of Artificial Sequence: Reverse primer  
for PCR

<400> 18

ctaggtgctg cggacgct

18

<210> 19

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Forward primer  
for PCR

<400> 19

atgagtgtca ctatgaca

18

<210> 20

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Reverse primer  
for PCR

<400> 20

gttgcagagg caattcca

18

<210> 21

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Forward primer  
for PCR

<400> 21

tatgtgctct tctgcgtg

18

<210> 22

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

11/15

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Reverse primer  
for PCR

&lt;400&gt; 22

tcagtctgta gcatcagg

18

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Forward primer  
for PCR

&lt;400&gt; 23

tgttcattct catctgctgc

20

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Reverse primer  
for PCR

&lt;400&gt; 24

tatagtgcctt gtggtagagc

20

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Forward primer  
for PCR

&lt;400&gt; 25

gccacagaat ggaacacagt

20

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 20

12/15

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Reverse primer  
for PCR

&lt;400&gt; 26

ccagaactat gcccagacat

20

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Forward primer  
for PCR

&lt;400&gt; 27

tcattggcaa cttggctctc

20

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Reverse primer  
for PCR

&lt;400&gt; 28

ccagcatgtat gaaccactga

20

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Forward primer  
for PCR

&lt;400&gt; 29

tgctgaccaa tctgctgg

19

13/15

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Reverse primer  
for PCR

&lt;400&gt; 30

agtaggaaga caaggcaggct

20

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Forward primer  
for PCR

&lt;400&gt; 31

gccatcgcca aggtcaagct

20

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Reverse primer  
for PCR

&lt;400&gt; 32

actgttgtgc cctccagaaa

20

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Forward primer  
for PCR

&lt;400&gt; 33

14/15

ggcatggact ggatcctg

18

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Reverse primer  
for PCR

<400> 34

cagactcaact ggatctggat

20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Forward primer  
for PCR

<400> 35

tgagtgtcac tatgacaaggc

20

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Reverse primer  
for PCR

<400> 36

atgttgcaga ggcaattcca

20

<210> 37

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Forward primer  
for PCR

15/15

<400> 37  
tgctttctg cgtgctgg

18

<210> 38  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Reverse primer  
for PCR

<400> 38  
aaactgttgg aggagtcttg

20

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP02/02828
---

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl' G01N33/50, G01N33/15, G01N33/566, A61P13/12, A61K45/00
---

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC
---

B. FIELDS SEARCHED
--------------------

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl' G01N33/50, G01N33/15, G01N33/566, A61P13/12, A61K45/00
---

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2002 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2002 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2002
---

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAS ON LINE "EDG" JOIS "EDG"
---

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00/56135 A (The Regents of The University of California), 28 September, 2000 (28.09.00), (Family: none)	1-13
A	WO 99/35259 A (Allelix Biopharmaceuticals Inc.), 15 July, 1999 (15.07.99), (Family: none)	1-13
A	Molecular and Cellular Biology, December 2000, Vol.20, No.24, pages 9247 to 9261	1-13

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search 10 April, 2002 (10.04.02)	Date of mailing of the international search report 23 April, 2002 (23.04.02)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
--	--------------------

Facsimile No.	Telephone No.
---------------	---------------

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP02/02828

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. C1'	G 01N 33/50	G 01N 33/15	G 01N 33/566
	A 61P 13/12	A 61K 45/00	

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. C1'	G 01N 33/50	G 01N 33/15	G 01N 33/566
	A 61P 13/12	A 61K 45/00	

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年

日本国公開実用新案公報 1971-2002年

日本国登録実用新案公報 1994-2002年

日本国実用新案登録公報 1996-2002年

## 国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ON LINE	"EDG"
JOIS	"EDG"

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 00/56135 A (The Regents of The University of California) 2000.09.28, (ファミリーなし)	1-13
A	WO 99/35259 A (Allelix Biopharmaceuticals Inc.) 1999.07.15 (ファミリーなし)	1-13
A	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, December 2000, vol. 20, no. 24, p. 9247-9261	1-13

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 10.04.02	国際調査報告の発送日 23.04.02
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 官澤 浩 電話番号 03-3581-1101 内線 3250